Série A, n° 3870
N° d'ordre : 4721

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Hiroshi HARADA

1re **THÈSE.** — ETUDE DES SUBSTANCES NATURELLES DE CROISSANCE EN RELATION AVEC LA FLOPAISON. - Isolement d'une substance de montaison.

2e **THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 9 mai 1962, devant la Commission d'examen.

MM. CHOUARD.... . *Président.*
ULRICH..... *Examinateurs.*
LEMÉE.....

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1962

Série A, n° 3870
N° d'ordre : 4721

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Hiroshi HARADA

1re **THÈSE**. — Etude des substances naturelles de croissance en relation avec la floraison. - Isolement d'une substance de montaison.

2e **THÈSE**. — Propositions données par la Faculté.

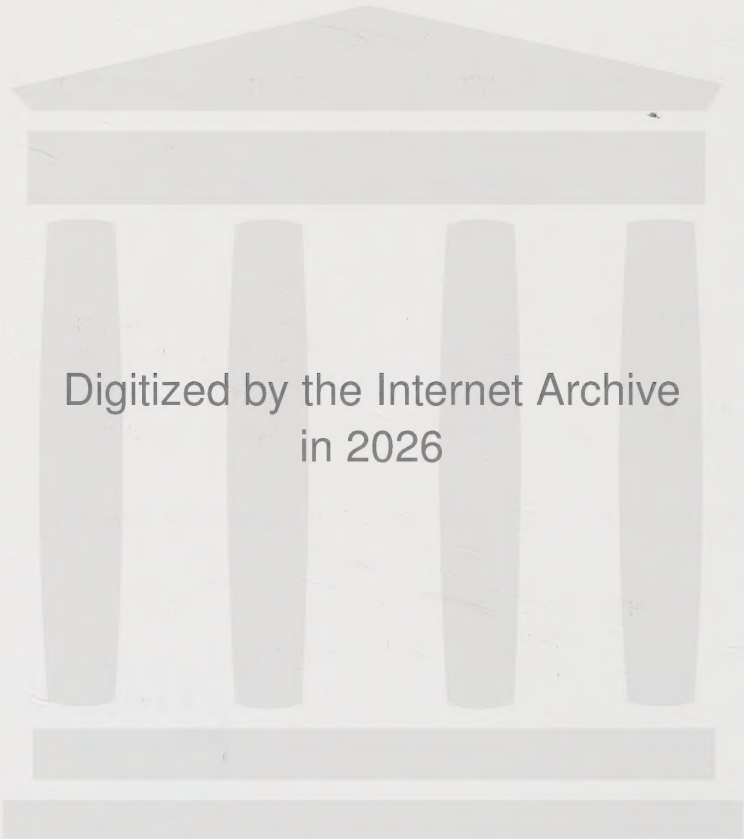
Soutenues le 9 mai 1962, devant la Commission d'examen.

MM. CHOUARD..... *Président.*
ULRICH..... *Examinateurs.*
LEMÉE.....

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1962


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538124_0045

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. ZAMANSKY

Professeurs :

G. JULIA	T	Anal. sup. et alg. sup.
DE BROGLIE...	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anat. et histol. comparées.
GRASSÉ.	T	Evol. des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
CHAUDRON ...	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie et cristallogr.
TEISSIER.....	T	Zoologie.
MANGENOT....	T	Biologie vég. (Orsay).
AUGER	T	Phys. quant. et relativité.
MONNIER	T	Physiol. générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD.....	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
M^lle COUSIN ..	T	Biolog. animale (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER.....	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI ...	T	Génétique.
RIVIÈRE.....	T	Géologie SPCN et sédim.
GAUTHERET...	T	Biologie végétale (P.C.B.).
R. LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET ...	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorol. et dyn. atmosph.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN ...	T	Botanique.
DE CUGNAC ..	T	Biologie végét. (S.P.C.N.).
M^lle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER ...	T	Physique du globe.
L'HERITIER...	T	Biolog. gén. (Orsay.)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL.....	T	Arith. et théor. des nombr.
QUELET.....	T	Chimie organique.
CAGNIARD.....	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER..	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ...	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscop. et diffr. électr.
WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.
JACQUINOT ..	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Phys. de l'atmosphère.
DESTOUCHES .	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (optique).
COUTEAUX ...	T	Biol. animale (P.C.B.).
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théor. des fonct. et topol.
FELDMANN ..	T	Biologie végét. marine (P.C.B.).
GUINIER	T	Phys. des solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathémat.
SCHWARTZ ...	T	Calcul. diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD ..	T	Aviation (Tech. aéronaut.)
BRELOT	T	Calcul différentiel et intég.
NORMANT ...	T	Synthèse organique gén.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT.....	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUÉ	T	Statist. mathématiques.
SOULAIRAC ..	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiol. végét.
MARÉCHAL....	T	Optique théor. et appl.
KIRRMANN ..	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD ..	T	Botanique.
M^lle LE BRETON	T	Physiologie de la nutri.
SALEM	T	Mathémat. générales.
LELONG.....	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS ..	T	Anatom. et histol. comp.
EHRESMANN ..	T	Topologie algébrique.
FRANÇON.....	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD .	T	Géogr. phys. et géol. dyn.
GODEMENT ..	T	Mathématiques (M.P.C.).
PISOT	T	Tech. mathém. de la phys.
ROCH.....	T	Géologie.
SCHATZMAN...	T	Astrophysique.
TERMIER.....	T	Paléontol. stratigraph.
ZAMANSKY....	T	Mathémat. générales.
LENNUIER ...	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER ...	T	Géologie appliquée.
M^me TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN.....	T	Electrotech. générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des Hautes Energies (Orsay)
M^me CHAIX...	T	Chimie biologique.
M^me HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.).
BRUN.....	T	Mécan. théor. des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
M^me DUBREIL	T	Mathémat. (Agrég.).
M^me LELONG .	T	Mathémat. (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
J. E. DUBOIS	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
A. MICHEL....	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER....	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ..	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER		Physiologie comparée.
CAMUS.....		Physiolog. végét. (BMPV).
CASTAING.....	T	Physique (Orsay).
CURIEN	T	Minéral. et cristall.
MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).
NOIROT		Evol. des êtres organisés.
PANNETIER...	T	Chimie générale (Orsay).
POSSOMPES ..	T	Zoologie.
PULLMANN ..	T	Chimie théorique.
TEILLAC	T	Phys. nucl. et rad. activit.
TONNELAT ...	T	Biologie physico chim.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART...		Chimie (P.C.B.).

Dode	T	Chimie (Orsay).
Freymann ...	T	Recherches physiques.
Guinochet ..	T	Biolog. vég. SPCN (Orsay).
Rollet.....	T	Chimie (P.C.B.).
Mlle Josien...	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley...	T	Géom. alg. et théor. d. gr.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle.....	T	Physique (Orsay).
Delange	T	Mathémat. (Orsay).
Deny	T	Mathémat. gén. (Orsay).
Germain.....	T	Mécan. théor. des fluides.
G. Lucas	T	Géologie.
Allard.....	T	Chimie physique.
Berthelot ..	T	Phys. fondam. des htes énergies (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et phys. de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard.		Psychophysiologie.
Friedel		Phys. des solides (Orsay).
M. Julia.....		Etudes des moléculaires natur. complexes.
Lender	T	Biol.animale (SPCN) (Ors.)
Magat		Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod.....	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay).
De Possel ..	T	Analyse numérique.
Charlot.....	T	Chimie analytique.
Haissinsky .	T	Radiochimie.
Lemée	T	Physiol. vég. BMPV (Ors.).
Guérin.....	T	Chimie M.P.C. (Orsay).
M. Chatelet .		Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nuclé. (Orsay).
Mattler	T	Physique S.P.C.N.
Louis Michel		Phys. théorique des Haut. énergies (Orsay).
Bergerard...		Zoologie (Orsay).
Bertein		Electronique (Orsay).
Bouissières .		Chim. des radioélém. (Ors.)
Mme Couture		Therm. et mécan. phys.
Ellenberger.		Géologie appliq. s. le terr.
Franc.....		Biol. animale (P.C.B.).
Schnell.....		Botan. tropicale (Orsay).
Stolkowski..		Physiologie générale.
Acher		Chimie biol. (Orsay).
Baudoin.....		Biologie animale P.C.B.
Beaumont ...		Biologie animale S.P.C.N.
Blamont		Géophysique ionosphère.
Bourreau....		Botanique.
D. Curie		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga		Géologie.
Fréon.....	T	Chimie organ. (Orsay).
Heller		Physiologie végétale.
Tortrat.....		Calcul des probabilités.
Cailleux ...		Géologie (S.P.C.N.).
Magnan	T	Physique (S.P.C.N.).
Daudel	T	Mécan. ondul. appliquée à la chim. théor. et à la phys. nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biol. végét. (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat ...	T	Mécan. anal. et mécan. cél.
Mlle Veil.....		Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck .	T	Mécan. phys. et expérim.
Lacombe	T	Métall. des métaux nuclé.
Brochard ...	T	Physique P.C.B. (Orsay).
Cabannes ...	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mécan. M.P.C. (Orsay).
Mazet.....	T	Mécaniq. générale (Orsay).
Caire		Géographie phys. et géol. dynamique.
Comolet		Mécanique des fluides.
Corabœuf...		Physiologie animale.
Delloue		Physique de l'exosphère.
Gorenflot ..		Botanique II (Orsay).
Houillon ...		Biologie animale P.C.B.
J. Jullien...		Chimie P.C.B.
Malgrange..		Tech. math. de la physiq.
Olivier		Anthropologie.
Nozeran.....	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre..		Physique E.N.S. (Orsay).

Secrétaire général ..... R. Poullain

ÉTUDE DES SUBSTANCES NATURELLES DE CROISSANCE EN RELATION AVEC LA FLORAISON

- Isolement d'une substance de montaison -

par M. **Hiroshi HARADA**

AVANT-PROPOS

Le présent travail a pour objet l'étude des substances de croissance présentes dans les points végétatifs d'Angiospermes au cours de l'induction florale. Le travail a porté sur un certain nombre d'espèces différentes appartenant à 6 familles. Nous avons pu mettre en évidence l'existence de nouvelles substances de croissance au moment de la montée à fleur ; nous nous sommes efforcés d'isoler ces corps et d'étudier leurs propriétés chimiques et biologiques. Ce programme a été réalisé le plus complètement dans le cas d'*Althaea rosea*.

Depuis son début à Ithaca (U.S.A.) jusqu'à son achèvement à Gif, ce travail a été dirigé par M. J.-P. Nitsch, alors Professeur à l'Université de Cornell. M. Nitsch m'a initié à la recherche et a suivi mon travail depuis son début. Je tiens à lui présenter mes respectueux remerciements pour les conseils et les encouragements amicaux qu'il n'a cessé de me donner.

Je remercie vivement M. le Professeur P. Chouard, qui s'est toujours intéressé à mon travail et a accepté de présider la soutenance de cette thèse.

Je remercie M. le Professeur R. Ulrich, mon parrain au Centre National de la Recherche Scientifique, et M. le Professeur G. Lemée qui ont bien voulu accepter d'être les membres de mon Jury.

J'exprime ma profonde gratitude à Mme C. Nitsch pour son assistance technique et pour la gentillesse avec laquelle elle a su aplanir pour moi les difficultés que peut rencontrer un étranger.

Je remercie MM. J.-C. Gandar et M. Sandmeier pour leurs critiques amicales, leur assistance technique, et leurs conseils linguistiques.

Je remercie Mmes A. Masset et J. Ivart, Mlles C. Deforeit, S. Hamon et H. Fouqué, MM. Ed. Kruch, L. Masset, P. Renault, pour leur aide matérielle.

Que tous mes camarades du Laboratoire trouvent ici l'expression de ma cordiale gratitude.

J'exprime ma reconnaissance à MM. les Directeurs et Administrateurs du Centre National de la Recherche Scientifique pour l'aide financière qu'ils m'ont accordée.

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION ET HISTORIQUE :

La notion de substance de floraison

L'étude de la physiologie de la floraison est importante non seulement du point de vue théorique mais également du point de vue pratique. En floriculture, la fleur est le produit final recherché. En agriculture, la floraison est indispensable à la production des graines ainsi qu'à celle des fruits. Inversement beaucoup de plantes potagères sont utilisées à l'état végétatif, et, dans ce cas, la floraison doit être évitée. La connaissance de ses lois revêt donc un intérêt considérable qui explique l'abondance des travaux consacrés à son étude. De nombreuses et excellentes mises au point ont été publiées sur ce sujet ; nous ne pouvons les évoquer toutes (Bonner et coll. 1952, Borthwick 1947, Borthwick et coll. 1950, 1961, Carr 1952, Cholodny 1939, Chouard 1960, Gregory 1948, Hamner et coll. 1938, Hamner 1944, 1948 a, b, Lang 1952, 1961, Leopold 1951, Liverman 1955, Lockhart 1961, Melchers 1939, Murneek 1953, Naylor 1953, 1961, Parker et coll. 1950, Purvis 1961, Salisbury 1958, 1961, Tchaïlachian 1936 a, b, 1937, Wellensiek et coll. 1954, 1956, Whyte 1948).

Au cours de ces études est apparue puis s'est précisée peu à peu la notion que, dans certains cas tout au moins, la floraison était provoquée par un complexe transmissible de facteurs chimiques. C'est dans cette perspective que se situe notre travail.

CHAPITRE PREMIER

LA NAISSANCE DE L'IDÉE DE L'EXISTENCE D'UNE SUBSTANCE DE FLORAISON

L'idée de l'existence possible d'une substance de floraison remonte à Sachs (1865), qui peut être considéré comme le fondateur de la physiologie moderne de la floraison. A côté de l'existence

d'autres substances présidant à la croissance des racines, tiges et feuilles, Sachs supposait déjà l'existence d'une substance de floraison qui, en petites quantités, présiderait à la formation des fleurs. Mais, plus tard, l'idée de l'existence de substances spécifiques s'effaça pour un temps devant une nouvelle théorie. Klebs (1913, 1918) avait démontré que la floraison chez *Sempervivum Funkii* était sous la dépendance de facteurs extérieurs, c'est-à-dire de la lumière, de l'humidité et de la nutrition minérale. Il élabora une théorie selon laquelle une teneur relativement élevée d'hydrates de carbone par rapport aux éléments minéraux nutritifs déterminerait la floraison. A la suite de Klebs, Kraus et Kraybill (1918) généralisèrent la notion du rapport C/N en tant que base fondamentale de l'état végétatif ou florifère. Cette dernière théorie a dominé la littérature agricole pendant très longtemps.

Les recherches sur le déterminisme de la floraison s'orientèrent par la suite vers l'étude des facteurs extérieurs pouvant déterminer l'époque de la floraison, c'est-à-dire vers la recherche de l'action de la température et de la longueur du jour sur la mise à fleurs. Les recherches sur l'effet des basses températures débutèrent à la suite d'une découverte de Gassner (1918). Gassner avait montré que si des graines germées de céréales d'hiver sont exposées au froid pendant une certaine période, elles produisent des plantes qui fleurissent normalement, même si ces graines sont semées en été. L'action de la basse température ne s'extériorise qu'après son application, c'est-à-dire que lorsque les plantes sont replacées à une température normale. On a donné à cet effet le nom de « vernalisation ».

Plus tard, Melchers (1936) démontra que le traitement par les basses températures pouvait, dans le cas de la jusquiame bisannuelle (*Hyoscyamus niger*), être remplacé par le greffage d'un apex vernalisé à proximité d'un bourgeon non-vernalisé. Ce résultat indique que le stimulus produit par la vernalisation peut être transmis par greffage et induire la floraison de bourgeons d'*Hyoscyamus* non-vernalisés. Melchers appela ce stimulus « vernaline ».

D'autre part, avant même les travaux de Melchers sur la vernalisation, Garner et Allard (1920) avaient démontré que la longueur relative du jour et de la nuit jouait un rôle décisif dans la floraison de nombreuses espèces. Ils proposèrent le nom de « photopériodisme » pour désigner la réaction des plantes à l'alternance quotidienne du jour et de la nuit, et groupèrent les plantes en trois catégories présentant des réactions différentes à cette photopériode : plantes de jours courts, plantes de jours longs, et plantes indifférentes. A la suite de cette découverte on se mit

à chercher quel était l'organe sensible aux différences de longueur des jours. En 1934, Knott démontra que les feuilles vertes sont les organes sensibles à la durée du jour, du moins dans le cas de l'épinard. Il pensa qu'une substance ou un stimulus synthétisé dans les feuilles était transporté vers les méristèmes apicaux. Peu après, des observations identiques furent faites avec des chrysanthèmes par Tchaïlachian (1936 a) et Moshkov (1936 a, b) et, avec des *Perilla*, par Ljubimenko et Buslova (1937). Moshkov (1936 a) remarqua que les plus larges des jeunes feuilles sont les plus sensibles à l'induction photopériodique. La transmission du stimulus photopériodique par greffage d'une plante induite sur une plante végétative put être démontrée par de nombreux auteurs utilisant des plantes différentes : Tchaïlachian avec des *Perilla* et des *Helianthus* (1936 b), Kuyper et Wiersum avec des sojas (1936) et Moshkov avec des tabacs (1937). Plusieurs années après la découverte de l'hormone de la croissance par Went en 1926, Tchaïlachian (1936 a) émit l'hypothèse de l'existence d'une substance réglant le processus du développement de la fleur. Il donna le nom de « florigène » à cette hormone de floraison (1936 b). Plus tard, Cholodny (1939) proposa le nom d' « anthésine ».

De nombreux chercheurs essayèrent d'isoler une substance capable de provoquer la floraison chez les plantes végétatives. Mais tous ces essais furent vains. Cet insuccès suggéra l'hypothèse selon laquelle une plante serait toujours capable de former des fleurs mais en serait empêchée dans certains cas par un mécanisme inhibiteur qui jouerait le rôle principal au cours du phénomène. Après les remarques de Lona (1948), Gregory (1948) et Resende (1949), cette idée fut clairement exprimée par Von Denffer (1950). La floraison des plantes photopériodiques serait inhibée par des longueurs de jour défavorables. L'inhibition serait levée lorsque les plantes sont soumises à un régime de photopériodes favorables. Wellensiek et coll. (1954) supposent, eux aussi, que la photopériode favorable lève une inhibition. L'inhibition de la floraison par des auxines a été démontrée chez de nombreuses espèces de plantes de jours courts (Salisbury, 1955). Cependant de faibles doses d'auxine appliquées à des plantes en photopériodes défavorables peuvent stimuler la floraison (Zeeuw et coll., 1956). L'époque du traitement n'est pas indifférente, son effet étant plus important, pour l'inhibition, avant l'induction florale qu'après (Salisbury, 1955).

CHAPITRE II

LES CAS ANTÉRIEUREMENT PUBLIÉS D'EXTRACTION DE SUBSTANCES DE FLORAISON

Cependant l'idée d'hormone de floraison continuait à inspirer de nombreuses recherches. J. et D. Bonner (1948) induirent la floraison de *Xanthium* avec des extraits d'inflorescences de *Washingtonia robusta*, mais ne purent répéter l'expérience (Naylor, 1961).

En 1951, Roberts extrayait par le kerosène (solvant obtenu par fractionnement du pétrole), à partir de *Xanthium* fleurissants, une substance liposoluble. D'après Roberts, cette substance, pulvérisée en solution huileuse sur les feuilles, stimulerait beaucoup la floraison de *Xanthium* ayant reçu une seule journée courte. Roberts (1959) a proposé le nom d'« anthogène » pour désigner l'hormone de floraison qu'il dit avoir isolé du *Xanthium* fleurissant.

En 1961, il annonçait l'extraction, à partir de plantes fleurissantes, de trois hormones lipidiques, avec lesquelles il avait traité des plantes de soixante-dix espèces ou variétés, appartenant à 20 familles différentes, et obtenu la floraison malgré une photopériode défavorable. D'après lui, l'anthogène des plantes de jours courts peut être utilisé par les plantes de jours longs et réciproquement (Roberts et coll., 1961).

Sironval (1954) montra que l'extrait de feuilles de fraisiers des quatre-saisons poussant en journées de 16 heures est beaucoup plus riche en vitamine E et en stérols que l'extrait de feuilles de ces plantes recevant des jours de 8 heures. En appliquant la fraction insaponifiable de l'extrait de feuilles de plantes élevées en jours de 16 heures sur des plants isolés de plantes-mères en fleur, il a réussi à faire fleurir les bourgeons axillaires de ces plants alors que, chez les témoins, ces bourgeons axillaires ne produisaient que des feuilles. Il montra, de plus, que l'activité de l'insaponifiable d'une plante en fleur varie avec les saisons (meilleurs résultats en juin-juillet). Cependant l'extrait le plus actif n'agit pas sur des plants placés en jours courts ; les feuilles exposées aux jours courts inhibent son activité. D'ailleurs, l'extrait ne provoque la floraison ni des plantules, ni des plantes se trouvant à la photophase de leur développement.

Tous les insuccès précédents se rapportent à des plantes de jours courts. Les résultats furent tout différents lorsque, à la suite des inductions florales réalisées avec les gibbérellines, on se mit à faire des extraits de plantes de jours longs. C'est ainsi que Lona, en 1957, à l'aide d'un extrait de plantes de jours longs pré-

paré comme pour l'extraction de gibbérellines, fit fleurir des plantes de la même espèce élevées en photopériode défavorable. Lang et coll. (1957), firent monter et fleurir des *Hyoscyamus niger* non vernalsés et des *Samolus parviflorus* placés en jours courts en les traitant par l'albumen liquide d'*Echinocystis macrocarpa* que Phinney et coll. (1957) avaient montré contenir une dose élevée de gibbérellines.

En 1958, Tchaïlachian formulait une nouvelle hypothèse : les hormones de floraison ou florigènes comprendraient deux groupes de substances : les gibbérellines indispensables à la formation des tiges et les « anthésines », indispensables à la formation des fleurs (1958 a). Les plantes photopériodiquement indifférentes fabriqueraient à la fois des gibbérellines et des anthésines ; la non-floraison des plantes de jours longs placées en jours courts serait due à un défaut de gibbérellines, la non-floraison des plantes de jours courts placées en jours longs, à un défaut d'anthésines ; la non-florasion des plantes bisannuelles non vernalisées est due, lorsqu'elles sont placées en jours longs, à l'absence de gibbérellines, et, lorsqu'elles sont placées en jours courts, à l'absence de gibbérellines et d'anthésines.

Afin d'étayer cette hypothèse, Tchaïlachian et Lojnikova (1959) effectuèrent une série d'expériences sur des *Rudbeckia bicolor* en rosettes provenant d'un semis de printemps et maintenus constamment en journées de 9 heures. Chaque jour, pendant trois mois, ces plantes recevaient au centre de la rosette une goutte de l'extrait étudié, de gibbérelline à 0,02%, ou d'eau ; les extraits étaient ceux de feuilles de plantes qui avaient été placées soit en jours longs, soit en jours courts. Trois espèces servirent à la préparation des extraits : tabac « Mammoth » perilla rouge, *Rudbeckia bicolor*. Les *plantes-test* furent placées en jours courts de 9 heures et les traitements appliqués pendant trois mois. Tchaïlachian et Lojnikova conclurent que tous les extraits étudiés contenaient des substances du type gibbérelline, mais que leur quantité dans les extraits de feuilles de plantes exposées aux jours longs était plus élevée que dans les extraits de feuilles de plantes exposées aux jours courts.

Jusqu'aux travaux de Lincoln et coll. (1961) l'isolement d'une hormone de floraison capable de faire fleurir les plantes de jours courts placées en jours longs, n'avait pu être répété, soit par les auteurs eux-mêmes, soit par d'autres chercheurs, le procédé utilisé restant secret. Lincoln et ses collaborateurs firent fleurir des *Xanthium* placés en jours longs en les traitant par des extraits méthanoliques de feuilles jeunes et de bourgeons de *Xanthium strumarium* var. *canadense* induits. Au dire de ces auteurs, ces expériences peuvent être répétées et la purification du ou des agents responsables de cet effet est en cours.

CHAPITRE III

RÉCENTES EXPÉRIENCES DE GREFFAGE

De nombreux auteurs continuant à mettre en doute l'existence du florigène, de nouveaux travaux ont eu pour but de mettre en évidence l'apparition, chez les plantes induites, d'un stimulus transportable et transmissible par greffage à une plante non induite.

Nous avons déjà cité les travaux de Melchers (1936) qui mettaient en évidence l'existence d'un stimulus transmissible par greffage, nommé « vernaline » par cet auteur. Lang (1952) a résumé tous les résultats positifs obtenus jusqu'en 1952 de transmission de stimulus par greffage. D'après Lang, Melchers et Khudairi (Lang, 1952) lorsque le porte-greffe a subi l'action d'une photopériode favorable, le stimulus se transmet au greffon non induit et le fait fleurir. Ce résultat a été obtenu par des greffages entre trois espèces (*Hyoscyamus niger*, *Nicotiana tabacum* var. « Maryland Mammoth », et *Nicotiana sylvestris*) qui exigent chacune des conditions différentes pour fleurir.

Depuis, de nouveaux résultats ont été publiés, et la possibilité de transmettre le stimulus de floraison d'une espèce à une autre confirmée ; il a été démontré par des greffages que le stimulus pouvait passer de *Sedum* à *Kalanchoë* (Carr et coll. 1954), de *Erigeron annuus*, *Rudbeckia bicolor* ou *Centaurea cyanus* à *Xanthium canadense* (Okuda 1954), de *Kalanchoë* à *Bryophyllum* ou *Cotyledon* (Resende 1954, 1955).

Tchaïlachian a confirmé en 1958 que les feuilles isolées (sans racines, ni méristème, ni bourgeon de tige), en l'absence de nutrition minérale, peuvent transmettre l'induction photopériodique et sont capables d'accumuler les substances spécifiques indispensables à la floraison (1958 b). Les recherches les plus complètes dans ce domaine ont été effectuées par Zeevaart (1958). D'après ses nombreuses et ingénieuses expériences, dont il a interprété les résultats en détail, l'induction photopériodique provoque la production d'un stimulus transmissible chez plusieurs plantes. Par ailleurs, certaines de ses expériences montrent que des feuilles en photopériode défavorable, surtout chez les plantes de jours longs, produisent des inhibiteurs de floraison. Zeevaart pense que les stimuli chez les espèces proches sont identiques, bien qu'il n'ait pu provoquer la floraison en jours longs du tabac « Maryland Mammoth » en le greffant sur la variété « Delcrest » (indifférente au photopériodisme).

Devant l'incohérence de nombreux résultats et l'existence d'un grand nombre d'exceptions aux lois proposées, il nous a

paru nécessaire de procéder, pour certaines des espèces étudiées, à une vérification de la possibilité de transmettre par greffage le stimulus de floraison d'une plante induite à une plante non induite. Ces expériences constituent la Deuxième Partie de cette thèse. Dans la Troisième Partie, nous étudierons les variations des niveaux des substances de croissance du type auxine et gibbérelline dans les apex au cours de l'induction florale. Ces expériences ayant mis en lumière la formation d'une substance particulière lors de la montaison, nous avons isolé cette substance et avons étudié ses propriétés biologiques (IV^{e} Partie) pour tenter d'élucider son rôle dans le déroulement de ces phénomènes (V^{e} Partie).

Afin d'alléger le texte, nous avons utilisé les abréviations suivantes : AIA : Acide 3-indolyl-acétique ; IAN : Nitrile de l'AIA ; IAE : Ester éthylique de l'AIA ; AG : Acide gibbérellique ; K : Kinétine ; JL : Jours longs ; JC : Jours courts.

DEUXIÈME PARTIE

EXPÉRIENCES SUR LA TRANSMISSIBILITÉ DE L'INDUCTION FLORALE

Existe-t-il un principe matériel particulier à l'état physiologique d'une plante induite à fleurir ? Les expériences de transmission de l'état florifère par greffage, évoquées au cours de l'Historique l'indiquent nettement. Il s'agit même là de la preuve fondamentale sur laquelle s'appuie la thèse de l'existence de substances de floraison. Ce point est si important comme point de départ de tout ce travail qu'il nous a paru bon de le vérifier sur notre matériel végétal.

CHAPITRE IV

ESSAIS DE TRANSMISSION PAR GREFFAGE

La façon la plus simple de démontrer le passage d'un principe inducteur d'une plante induite à une autre est de les greffer l'une sur l'autre. Nous avons employé cette technique pour deux types de plantes, des chrysanthèmes et des roses-trémières.

1. Chrysanthèmes

Nous avons réalisé les greffes entre deux variétés de chrysanthèmes de types physiologiquement différents : la variété « Shuokan » et la variété « Honeysweet ». La variété de chrysanthème japonais « Shuokan » est indifférente au photopériodisme, mais demande, pour fleurir, un traitement par le froid. Au contraire, la variété « Honeysweet » n'a pas besoin de vernalisation, mais exige strictement des jours courts pour fleurir.

Des plantes, aussi uniformes que possible, issues de boutures, ont été élevées en conditions non inductives, c'est-à-dire en jours longs (17 h.) et sans vernalisation préalable. Lorsqu'elles furent assez vigoureuses, la moitié des plantes de Shuokan fut placée en serre froide à 3°C pendant 4 semaines pour y être vernalisée, l'autre moitié restant soumise aux conditions précédentes.

Technique de greffage. — La greffe réalisée fut une greffe « en plaquage » ; le greffon et le porte-greffe furent entaillés jusqu'au cambium puis maintenus en contact par du raphia. Deux mois après, une seconde union entre eux fut réalisée de la même manière dans quelques cas (expériences I, IV, IV′, V du Tableau I), afin de favoriser les échanges d'assimilats entre porte-greffe et greffon (planche I).

Les combinaisons de greffage et les résultats obtenus ont été les suivants (Tableau I) :

I. — « Shuokan » vernalisé sur « Honeysweet » (en jours longs). — Les 6 greffons ont tous fleuri ; l'état végétatif du porte-greffe n'inhibe donc pas la floraison du greffon. Mais, inversement, la floraison du greffon de « Shuokan » vernalisé n'a pas changé l'état végétatif du porte-greffe.

II. — « Shuokan » non vernalisé sur « Honeysweet » (en jours courts). — Aucun des 6 greffons n'a fleuri, tandis que les bourgeons terminaux des porte-greffes ont fleuri. A l'état non vernalisé, la variété « Shuokan » ne peut donc pas être réceptrice de l'état induit du porte-greffe, mais l'état végétatif du greffon n'inhibe pas la floraison du porte-greffe.

III. — « Honeysweet » sur « Shuokan » non vernalisé (en jours courts). — Les 6 greffons fleurissent, les porte-greffes « Shuokan » restant en rosette.

L'état végétatif du porte-greffe n'inhibe pas la floraison du greffon, et, à l'état non vernalisé, la variété « Shuokan » n'est pas affectée par l'état florifère du greffon.

IV. — « Honeysweet » sur « Shuokan » vernalisé (en jours longs). — Les 6 tiges des porte-greffes « Shuokan » ont toutes fleuri. Quant aux greffons, 2 restèrent végétatifs, 2 donnèrent des « crown-buds » (1), et 2 fleurirent (planche I).

L'état végétatif du greffon n'inhibe donc pas la floraison du porte-greffe. Par contre, l'état induit du porte-greffe a partiellement provoqué la floraison du greffon qui n'a pas besoin de vernalisation. La même expérience a été répétée en enlevant les feuilles des greffons « Honeysweet » après la seconde union de greffe (Exp. IV′ du Tableau I). Dans ce cas, tous les 6 greffons produisirent des boutons à fleurs dont 3 cependant ne se développèrent pas au-delà du stade « crown-bud ». L'absence de feuilles sur le greffon a donc accentué sa réceptivité à l'égard du principe inducteur produit par le porte-greffe.

(1) Les auteurs anglo-saxons ont donné le nom de « crown-bud » au bouton de chrysanthème dont le développement s'est arrêté avant la différentiation des fleurons. Un « crown-bud » consiste donc en un réceptacle protégé par des bractées.

On peut tenter d'expliquer de deux manières l'effet de freinage produit par les feuilles du greffon. On peut d'abord supposer qu'elles produisent des inhibiteurs de la floraison. On peut aussi penser que la migration des assimilats du porte-greffe vers le greffon est ralentie quand le greffon porte des feuilles et, au contraire, accélérée lorsqu'il est défeuillé. Dans ce cas, la différence observée dans les pourcentages de floraison ne serait pas due à la présence d'inhibiteurs dans les feuilles du greffon, mais simplement à l'arrivée dans le greffon de quantités plus ou moins importantes du ou des stimuli provenant du porte-greffe.

V. — « Honeysweet » sur « Shuokan » non vernalisé mais traité par l'acide gibbérellique (en jours longs). — On sait qu'un traitement par l'acide gibbérellique (AG) de plantes de « Shuokan » non vernalisées provoque leur floraison (Harada et Nitsch 1959 b). D'autre part, le même traitement sur « Honeysweet » en jours longs ne provoque qu'une élongation de la tige sans la faire fleurir.

Des tiges de « Honeysweet » furent greffées sur des « Shuokan » non vernalisés et mis en jours longs. Les apex des porte-greffes « Shuokan » reçurent chaque semaine, pendant 3 mois, 10 mg de pâte à la lanoline contenant 10 mg d'AG par gramme de lanoline, soit environ 100 γ d'AG par application.

Dans cette expérience, les 6 porte-greffes ont fleuri ; deux mois plus tard, 5 sur 6 des greffons produisirent des boutons dont 2 s'arrêtèrent au stade « crown-bud » et 3 produirent des fleurs normales. La série de témoins correspondants (« Honeysweet » sur « Shuokan » non vernalisés, non traités par l'AG, placés en jours longs) n'a donné aucune fleur, ni chez les porte-greffes, ni chez les greffons.

Ce résultat confirme que le traitement par l'AG remplace bien la vernalisation chez le chrysanthème « Shuokan », mais surtout, il indique que l'AG ne provoque pas la floraison directement mais stimule la production d'un florigène qui, lui, est capable de faire fleurir la variété « Honeysweet », ce que ne peut faire l'AG seul. En tous cas, ces expériences montrent qu'un porte-greffe fleurissant de la variété « Shuokan », quelle que soit l'origine du processus qui l'a amené à fleurir, peut transmettre à un greffon de la variété « Honeysweet » la capacité de fleurir. Cette transmission est d'autant plus facile que le mouvement de la sève élaborée du porte-greffe vers le greffon est plus intense (cas de l'enlèvement des feuilles du greffon). Par contre on n'observe pas l'effet inverse (c'est-à-dire l'induction à fleurir du porte-greffe par le greffon).

TABLEAU I

Transmissibilité du stimulus floral : Expériences de greffage chez le chrysanthème.

N° de l'exp.	Combinaison de greffe	Photo-période de l'expérience (2)	Longueurs moyennes des tiges (3)	Nombre moyen de nœuds (3)	Nombre de plantes (1)			Nombremoyen de semaines du greffage à la floraison
					végétatives	avec « crown-buds »	fleurissantes	
I	G (4) : Shuokan vernalisé	J.L.	97 cm	51	0	0	6	22
	P (5) : Honey-sweet		149 cm	63	6	0	0	—
II	G : Shuokan non vernalisé	J.C.	5 cm	19	6	0	0	—
	P : Honey-sweet		17 cm	9	0	0	6	8
III	G : Honey-sweet	J.C.	18 cm	11	0	0	6	8
	P : Shuokan non vernalisé		6 cm	21	6	0	0	—
IV	G : Honey-sweet	J.L.	141 cm*	59*	2	2	2	28
	P : Shuokan vernalisé		91 cm	49	0	0	6	20
IV'	G : Honey-sweet défeuillé	J.L.	137 cm	56	0	3	3	28
	P : Shuokan vernalisé		88 cm	47	0	0	6	20
V	G : Honey-sweet	J.L.	132 cm *	65 *	1	2	3	28
	P : Shuokan non vernalisé traité par l'AG (6)		99 cm	52	0	0	6	19

2. Roses-trémières.

Des expériences de greffage ont été réalisées afin de voir si l'état vernalisé ou non vernalisé de la racine influe sur la mise à fleurs du bourgeon de la rose-trémière (*Althaea rosea* Cav.).

Après semis, repiquage, et rempotage d'une variété bisannuelle (Fordhook Giant Double Scarlet), la moitié des pots de roses-trémières a été mise en plein air, du 1er novembre au 18 avril afin de réaliser une vernalisation naturelle, l'autre moitié restant en serre (temp. minimum de 12°C).

Le 18 avril, par une variante de greffe anglaise, les greffes suivantes ont été réalisées :

a) bourgeon vernalisé sur racine non vernalisée,
b) bourgeon non vernalisé sur racine vernalisée.

Technique du greffage. — Le porte-greffe a été décapité à 1 cm du départ des racines. Afin d'empêcher l'apparition de bourgeons latéraux, l'épiderme du porte-greffe a été enlevé sur le centimètre de collet restant. Le porte-greffe n'a pas, comme dans le cas de la greffe anglaise, été coupé en biseau mais plutôt en marche d'escalier afin d'empêcher le glissement du greffon, le greffon (de deux centimètres et demi de long) étant taillé de façon à s'adapter au porte-greffe. L'ensemble a été maintenu en contact par une ligature de raphia.

Le 18 juillet, c'est-à-dire après 3 mois de greffage et de culture en serre à 12°C minimum, les 6 greffons vernalisés étaient en fleurs (Planche II), alors que les 6 greffons non vernalisés demeuraient en rosette végétative. Ces résultats confirment ceux de Melchers (1937) obtenus avec la jusquiame. Ils montrent que l'état vernalisé n'est pas transmissible de la racine vers le bourgeon et que l'état non vernalisé de la racine n'inhibe pas la floraison du greffon vernalisé.

A première vue, ces résultats sembleraient indiquer qu'il n'existe pas de stimulus de vernalisation transmissible. Mais on peut aussi penser que la racine ne possède pas les enzymes nécessaires à la fabrication d'une « vernaline », enzymes qui ne pourraient être formées que dans les tissus de tige après la vernalisation.

Notes du tableau I (ci-contre) :

(1) Sur un total de six greffes par expérience.
(2) Jours longs (J.L.) = 17 heures. Jours courts (J.C.) = 10 heures.
(3) A partir de l'union de greffage jusqu'à l'apex à la fin de l'expérience.
(4) Greffon.
(5) Porte-greffe.
(6) Une application de 10 mg de pâte à la lanoline contenant 10 mg/g d'AG, chaque semaine, pendant 3 mois.
(*) Les plantes restées végétatives sont exclues de ces moyennes.

CHAPITRE V

ESSAI DE TRANSMISSION PAR LA CUSCUTE

Au lieu de réaliser par greffage la liaison entre plante induite et plante non induite, nous avons pensé utiliser les tiges d'un parasite, *Cuscuta Gronovii* (1), qui, passant d'une plante à l'autre, pourraient transmettre ainsi le stimulus d'induction florale. Cette technique avait été employée avec succès par Bennett (1944) pour transmettre divers virus de la betterave.

Pour faire démarrer les plantes, nous avons semé les graines de cuscute autour de jeunes plantes d'*Impatiens* (technique indiquée par Mme Tronchet). Quand les tiges de cuscute furent bien développées, 6 plantes induites à fleurir de chacune des trois espèces *Chrysanthemum morifolium* « Honeysweet », *Xanthium pennsylvanicum* et *Perilla crispa*, furent placées autour des *Impatiens* parasitées. La cuscute se développa sur les nouveaux hôtes qui lui étaient offerts. Quand elle y fut bien implantée, les tiges furent détachées des *Impatiens*. Les hôtes induits et parasités furent placés à côté de plantes de même espèce non induites. La cuscute, en se développant, réalisa alors la liaison entre plantes induites et non induites.

L'induction florale des plantes avait été réalisée par des jours courts (10 h.), la durée du traitement variant selon l'espèce : 1 semaine pour les *Xanthium*, 2 semaines pour les *Perilla* et 4 semaines pour les chrysanthèmes. L'implantation du parasite et la culture des plantes induites et à induire eurent lieu ensuite en jours longs.

Toutes les plantes induites ont fleuri, mais les plantes non induites, quoique reliées aux plantes induites par des tiges de cuscute, sont toutes restées à l'état végétatif. La transmission espérée du « florigène » à travers les tiges de cuscute ne s'est donc pas produite.

L'échec de ces expériences peut avoir de nombreuses causes : impossibilité du passage du stimulus de la plante induite au parasite, destruction ou transformation du stimulus dans le parasite. Des expériences plus précises doivent être effectuées avant de tirer une conclusion définitive de ces échecs.

(1) Nous remercions Mme J. Tronchet, de l'Université de Besançon, qui nous a fourni les graines de cette espèce.

CHAPITRE VI

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. Expériences sur les chrysanthèmes.

Des expériences sur le greffage des chrysanthèmes « Honeysweet » et « Shuokan » on peut tirer les conclusions suivantes :

1) Dans le cas des variétés employées, il n'y a pas de transmission d'inhibiteur de floraison entre la partie non induite et la partie induite. Ces résultats semblent s'opposer à ceux de Von Denffer (1950) et Wellensiek et coll. (1954) qui avaient suggéré qu'un principe inhibiteur de la floraison était produit lorsque les conditions sont défavorables à la mise à fleur.

2) Le porte-greffe induit photopériodiquement ne provoque pas la floraison du greffon non vernalisé. Ce résultat est tout-à-fait conforme à la théorie classique qui veut que la « vernalisation » soit une étape préparatoire à l'induction florale et ne puisse absolument pas être remplacée, même par le florigène.

3) Par contre, le porte-greffe vernalisé provoque la floraison partielle du greffon non induit photopériodiquement d'une variété (Honeysweet) qui n'a pas besoin de vernalisation. Dans ce cas, nous avons observé que la transmission du florigène est irrégulière et ne semble s'effectuer qu'après la floraison de la partie induite de l'association. Ces expériences vont dans le sens des hypothèses émises par Wycherley (1952) travaillant sur *Cynosurus cristatus* et de Schwabe (1954) travaillant sur *Chrysanthemum morifolium*. Ces deux auteurs pensent qu'il existe deux stimuli successifs : le primaire correspondant à la vernalisation étant non mobile. Le second (correspondant à l'induction florale) serait mobile. L'existence de ces deux stades successifs expliquerait pourquoi nous n'avons observé la floraison des greffons (dans les expériences IV et IV' du Tableau I) que 8 semaines après la floraison des porte-greffes.

4) La défoliation du greffon semble faciliter le passage du stimulus du porte-greffe au greffon. Cette expérience confirme les résultats d'autres auteurs, par exemple ceux de Kruzhilin et coll. (1960) obtenus avec le chou. Un greffon (non induit) de chou greffé sur un porte-greffe de plante annuelle ne fleurit pas ; mais il suffit d'enlever les feuilles du greffon, pour que ce dernier fleurisse.

5) Si les expériences I-IV confirment des faits déjà connus, l'expérience V, par contre, apporte une contribution nouvelle au problème de l'induction florale par l'acide gibbérellique. Elle

montre, en effet, que l'acide gibbérellique ne cause pas la floraison directement, mais provoque la formation d'une autre facteur qui, lui, est bien directement florigène. En effet, l'AG est incapable de provoquer la floraison du chrysanthème « Honeysweet », alors qu'il provoque la floraison du chrysanthème « Shuokan ». Il suffit alors de greffer la variété « Honeysweet » sur la variété « Shuokan » et de traiter à l'AG le porte-greffe (Shuokan) pour provoquer la floraison du greffon (Honeysweet), selon la fig. 1.

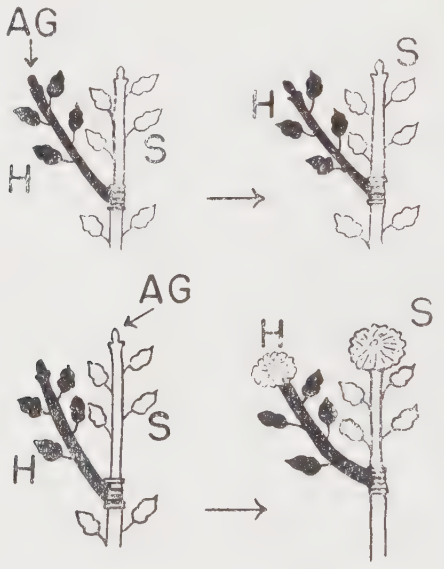


Fig. 1. — Démonstration de l'effet indirect de l'acide gibbérellique (AG) lors de l'induction florale.

En haut : une application d'AG sur la variété « Honeysweet » (H) ne provoque pas sa floraison. *En bas* : une application d'AG sur la variété « Shuokan » (S) produit la floraison de cette variété, et, ensuite, la floraison du greffon de « Honeysweet ».

En d'autres termes, l'AG a besoin de passer par la variété « Shuokan » pour provoquer la floraison du greffon « Honeysweet ». On peut expliquer ces résultats de la manière suivante :

a) la variété « Shuokan », pour fleurir, a besoin d'un stimulus de vernalisation V qui conditionne le démarrage de la production de florigène F ; la variété « Honeysweet », elle, n'a besoin que du florigène F, c'est-à-dire :

Shuokan → : V→ F→ fleurs
Honeysweet : F→ fleurs.

b) l'AG n'est pas le florigène F mais remplace la vernaline V, c'est-à-dire :

Shuokan : AG→F→fleurs.

L'AG conditionne donc la formation de F dans la variété de « Shuokan ». Ce florigène, une fois formé, provoque la formation de fleurs sur le porte-greffe et sur le greffron.

2. Expériences sur les roses-trémières

Dans le cas des roses-trémières, nous n'avons pas observé d'inhibition de la floraison produite par le porte-greffe non vernalisé sur le greffon vernalisé. Ce résultat est semblable au résultat d'expérience I obtenu avec les chrysanthèmes.

De même que pour les chrysanthèmes, un porte-greffe de rose-trémière induit à fleurir (vernalisé) a été incapable de provoquer la floraison d'un greffon non vernalisé (*cf.* expérience nº 2 des chrysanthèmes).

Nous pensons pouvoir dire qu'en l'absence de vernalisation, une plante qui a besoin de la vernalisation ne peut pas utiliser le stimulus floral venant d'une autre plante.

3. Expériences avec la cuscute

Dans nos expériences de transmission du stimulus par l'intermédiaire des tiges de *Cuscuta Gronovii*, nous n'avons pas obtenu de résultats positifs avec les trois plantes utilisées, *Xanthium*, *Perilla* et chrysanthème, var. « Honeysweet ».

Nous voyons plusieurs explications possibles à cet échec :

1) la transmission du stimulus de la plante induite à la cuscute ne se produit pas ;

2) la transmission se fait d'une manière insuffisante ;

3) les tissus dans lesquels circulent le stimulus ne sont pas en contact direct avec les suçoirs de cuscute, ce qui empêcherait la transmission ;

4) la transmission s'effectue, mais le stimulus est détruit ou transformé lors de son passage à travers la cuscute ;

5) la transmission du stimulus s'effectue bien à travers la cuscute, mais il n'entre pas dans la plante non induite ou entre en quantité trop faible pour provoquer l'induction.

D'autres expériences sont nécessaires pour élucider la ou les causes de la non-transmission du stimulus floral par la cuscute. En tous cas, elles s'accordent avec l'observation de Baldev (1960) selon laquelle la floraison d'une cuscute de jours courts (*Cuscuta*

reflexa) est totalement indépendante de la floraison des plantes-hôtes.

En résumé, l'état vernalisé n'est pas transmissible et les espèces qui ont un besoin absolu de vernalisation ne peuvent réagir au stimulus de floraison tant qu'elles n'ont pas été vernalisées. Dans le cas d'espèces n'ayant pas besoin de vernalisation, par contre, on peut mettre en évidence l'existence d'un facteur de floraison transmissible par greffage, mais non par la cuscute (laquelle peut transmettre des virus). Enfin l'acide gibbérellique, qui n'est pas identique au florigène, peut remplacer le froid pour la vernalisation du chrysanthème « Shuokan » et déclancher la production d'un florigène qui peut alors être transmis par greffage à une variété n'ayant pas besoin de vernalisation (Honeysweet) et la faire fleurir.

Ces résultats, qui sont en accord avec ceux de nombreux auteurs, suggèrent la production de substances chimiques diverses au cours de l'induction florale. Nous sommes ainsi amenés à aborder l'étude des variations des substances endogènes au cours de l'induction florale.

TROISIÈME PARTIE

VARIATIONS DES SUBSTANCES DE CROISSANCE DU TYPE AUXINE ET GIBBÉRELLINE AU COURS DE LA MISE A FLEUR

Lors du passage de l'état végétatif à l'état reproducteur, certaines espèces de plantes présentent des changements de port très prononcés, comme la transformation d'une rosette de feuilles, pratiquement dépourvue de tige, en une longue hampe florale. Ces changements suggèrent l'existence de modifications profondes dans le métabolisme des substances de croissance du type auxine et gibbérelline, modifications qui semblent en général liées intimement à l'induction florale proprement dite, c'est-à-dire à la transformation des méristèmes. Or, s'il n'existe pas encore, à l'heure actuelle, de techniques bien au point pour le dosage des florigènes, il existe des méthodes permettant l'étude des substances d'élongation. C'est l'étude des variations de ces substances au cours de l'induction florale et des premiers stades de la floraison qui va être décrite dans ce chapitre.

CHAPITRE VII

TECHNIQUES

1. Matériel végétal

Pour étudier les modifications du métabolisme hormonal au cours de la vernalisation et de la mise à fleur, nous avons employé plusieurs espèces de plantes qui appartiennent, du point de vue de la physiologie de la floraison, à trois groupes différents :

a) Plantes de jours longs :

Rudbeckia speciosa Wend.,
Nicotiana sylvestris Spegaz. et Comes.

b) Plantes de jours courts :

Nicotiana tabacum L. (var. Maryland Mammoth),
Chrysanthemum morifolium Ram. (var. Shasta),
Pharbitis Nil Chois.,
Perilla crispa (Thumb.) Tanaka,
Chenopodium rubrum L.

c) Plantes nécessitant un traitement par le froid :

Chrysanthemum morifolium Ram. (var. Shuokan),
Althaea rosea Cav. (var. Fordhook Giant Double Scarlet).

Les *Rudbeckia* sont un excellent matériel, car leur réaction au traitement photopériodique est très caractéristique et a été étudiée en détail, notamment par Murneek (1940), et Harder et Springorum (1947). Il en est de même pour le *Nicotiana sylvestris* qui a fait l'objet d'études par Melchers et Lang (1941) et Zeevaart (1957).

Le chrysanthème « Shasta » est une variété commerciale aux Etats-Unis. La fleur est du type « anémone », de couleur blanche ; elle exige normalement dix semaines de jours courts pour parvenir à l'épanouissement des capitules. Le tabac « Maryland Mammoth » est une plante typique de jours courts. Sa réaction photopériodique a été décrite par de nombreux auteurs, tels que Allard (1919), Garner et Allard (1920), Lang (1942), Vlitos et Meudt (1954). *Pharbitis Nil* (Nakayama, 1958 ; Takimoto et Ikeda, 1959, a, b, c, d ; Tashima et Imamura, 1953), *Perilla crispa* (Zhdanova, 1945 ; Zeeuw, 1953) et *Chenopodium rubrum* (Cumming, 1959) ont une réaction photopériodique de plantes de jours courts qui a été très bien étudiée. Malheureusement, les bourgeons de ces espèces sont très petits, ce qui a rendu difficile l'étude des variations du métabolisme hormonal par la méthode que nous avons employée.

Le chrysanthème « Shuokan » est une variété japonaise à grandes fleurs jaunes du type « pompon » ; elle est indifférente au photopériodisme, mais elle a besoin de vernalisation pour fleurir rapidement (Okada 1955, 1957). La variété de rose-trémière (*Althaea rosea*) « Fordhook Giant Double Scarlet » est une variété bisannuelle, qui a besoin d'être vernalisée pour fleurir. Du point de vue des exigences photopériodiques, elles est préférentiellement de jours longs.

2. Préparation des échantillons

A la fin des traitements photo- ou thermo-périodiques, les points végétatifs de plantes vigoureuses ont été prélevés avec les très jeunes feuilles qui entourent les apex. Dans le cas du tabac, la longueur de ces feuilles n'excédait pas 2 cm ; pour les autres espèces, elle était au maximum de 1,5 cm. A la récolte, le matériel végétal a été immédiatement congelé à -25°C, broyé au mortier, à l'état congelé, puis lyophilisé ; une fois sec, il a été réduit en poudre très fine, que nous avons conservée dans un dessiccateur à 3°C.

Pendant toutes ces manipulations, nous avons tenté de maintenir les mêmes conditions expérimentales pour les Rudbeckias, les chrysanthèmes « Shuokan » et les chrysanthèmes « Shasta ».

Pour les autres plantes, les bourgeons terminaux ont été immédiatement extraits à l'état frais avec du méthanol redistillé, glacé.

3. Méthodes d'extraction

Le méthanol redistillé a été employé comme solvant d'extraction, suivant les recommandations de Nitsch (1955).

a) *Quantité de matériel employé.* — En général, nous avons employé les quantités suivantes de matériel pour chaque extraction (poids sec représentant de 10 à 15 % du poids frais) :

Rudbeckia et chrysanthème « Shasta » : 50 mg de matériel sec.
Chrysanthème Shuokan » : 25 mg de matériel sec.

Pour les deux variétés de tabac, les roses-trémières, *Pharbitis*, *Chenopodium* et *Perilla*, nous avons utilisé de 1 à 1,5 g de matériel végétal frais pour chaque extraction, l'équivalent de 250 mg de matériel frais étant utilisé pour chaque chromatogramme. (Ces poids correspondent, en moyenne, aux nombres d'apex suivants : Rudbeckia 3, Chrysanthème « Shasta » 1,5, Chrysanthème « Shuokan » 1/4, tabac 1, rose-trémière 1/2, *Pharbitis* 10, *Chenopodium* 5, *Perilla* 5).

b) *Extraction.* — Les extractions ont été répétées trois fois (3×20 cc. de méthanol) sur le même matériel maintenu aux environs de 0°C par un bain de glace fondante, le solvant d'extraction étant changé toutes les vingt minutes, ce qui porte à 1 heure la durée totale d'extraction.

Les extraits ont ensuite été évaporés à sec sous vide et repris par un minimum de méthanol pour être appliqués alors sur les lignes de départ des chromatogrammes.

4. Chromatographie

Pour séparer les différentes substances de croissance contenues dans les extraits, nous avons eu recours à la chromatographie sur papier. La technique employée a été celle de J.P. et C. Nitsch (1955), qui utilise des bandes de papier Whatmann 3 MM de 2 ou 3 cm de largeur en chromatographie ascendante.

Le solvant a été principalement le mélange isopropanol (80% : eau 20%) ; d'autres solvants ont été utilisés, mais ils se sont avérés moins bons que le mélange isopropanol-eau.

La migration du « spot » sous l'action du solvant s'est effectuée sur une longueur de 20 centimètres, après une équilibration d'au moins six heures, la température de la salle de chromatographie étant de 15°C.

5. Test biologique

L'activité biologique a été déterminée au moyen du test mésocotyle (Nitsch et Nitsch, 1956 a) qui permet de mesurer l'activité des différentes zones des chromatogrammes sans élution préalable. Les bandes de papier sont divisées en 20 parties égales entre les Rf (1) 0 et 1. On ajoute, comme témoins, des bandes de papier prises au-dessous du spot de départ et au-dessus du front du solvant. Chaque morceau de papier est placé dans un tube à essais, de 14 mm de diamètre, avec 1 cc. d'une solution tampon (citrate-phosphate à environ 10^{-2}M) de pH 5,0 contenant 0,1% de « Tween 80 » (polyoxy-ethylène sorbitan monooleate) et 2% de saccharose.

Chacun des tubes ainsi préparés reçoit 10 sections de mésocotyles (premiers entre-nœuds) d'avoine (variété Brighton). Pour ce test, les avoines sont cultivées à l'obscurité complète, à une température de 25°C dans des boîtes complètement fermées et remplies de « Vermiculite » (mica expansé) humide. Au bout de 65 heures, on prélève sur le premier entre-nœud de ces plantules des segments de 4 mm $\pm$ 0,05 mm à 2 mm en-dessous du nœud, zone qui a été déterminée par J.-P. et C. Nitsch (1956 a) comme étant la plus sensible aux substances de croissance. Toutes ces manipulations

(1) Le Rf, abréviation du terme anglais « ratio front » est la valeur du rapport entre la distance de migration du front du solvant et celle de la substance considérée. Il varie donc de 0 à 1.

sont faites à la lumière verte, de 5400A, qui a très peu d'action sur la croissance des mésocotyles. Une lumière rouge, au contraire, en inhiberait totalement l'élongation.

Les tubes ainsi garnis sont placés presque horizontalement dans une machine tournante faisant un tour par minute.

Après 20 heures de croissance à l'obscurité et à 25°C, on mesure l'élongation à 0,05 mm près, au moyen d'un binoculaire à micromètre objectif.

A chaque série de tubes on ajoute des témoins contenant une gamme de concentrations différentes d'AIA, 1, 3, 10, 30 γ/l. L'activité des substances naturelles est rapportée à la quantité d'AIA qui produirait la même élongation des mésocotyles.

Par mesure de simplification, nous avons désigné les substances actives mises en évidence dans les extraits par des lettres (A, B, C, D, E, F) suivant leurs Rf dans l'isopropanol à 80 %, A étant la substance la moins mobile et F celle ayant la position la plus éloignée de la ligne de départ. Les substances décelées au cours de notre travail avaient des Rf généralement compris entre les valeurs suivantes :

A : 0,0-0,1 ; B : 0,1-0,3 ; C : 0,25-0,45 ; D : 0,40-0,65 ; E : 0,55-0,85 ; F : 0,9-1,0.

Il est évident que cette terminologie ne préjuge en rien de la nature de chacun de ces corps et que la substance A de *Rudbeckia speciosa* n'est pas nécessairement identique à la substance A de chrysanthème « Shasta » par exemple.

6. Valeur statistique de la méthode employée

Dans quelle mesure la méthode de chromatographie, suivie de la détection des zones d'activité biologique, donne-t-elle des résultats réguliers ? Pour en avoir une idée, nous avons fait 3 chromatographies identiques du même extrait de bourgeons de chrysanthème « Honeysweet ». Les trois histogrammes ont été réunis dans la fig. 2. On voit immédiatement qu'ils se ressemblent beaucoup.

Nous avons fait le test F :

1) Pour des tubes témoins qui contenaient chacun un fragment de chromatogramme découpé soit en-dessous de la ligne de départ, soit au-dessus de la ligne d'arrivée ;

2) pour les tubes contenant 3, 10 30 γ/l d'AIA.

Comme les valeurs de F (le rapport des variances) sont inférieures ou très proches de 1, les différences à l'intérieur des séries identiques ne sont pas significatives en prenant comme seuil de signification la probabilité 0,20.

10 mésocotyles par tube de témoin mesurant (en mm) :

											$\bar{X}$
Tube I	4,6	4,8	4,6	4,8	4,7	4,9	4,9	4,8	5,0	4,5	4,76
Tube II	4,9	4,8	5,0	4,8	4,7	4,6	5,0	4,6	5,0	4,6	4,80
Tube III	4,5	4,7	4,9	4,8	4,9	4,6	4,5	5,1	4,6	4,6	4,72
Tube IV	4,5	4,6	4,8	4,9	4,6	4,9	4,7	4,9	4,6	4,5	4,70
Tube V	4,6	5,3	4,7	4,7	4,7	4,8	4,7	5,0	4,5	4,5	4,75
Tube VI	4,8	4,7	4,8	4,9	4,9	4,9	4,9	4,5	5,2	4,9	4,85

F = 0,851

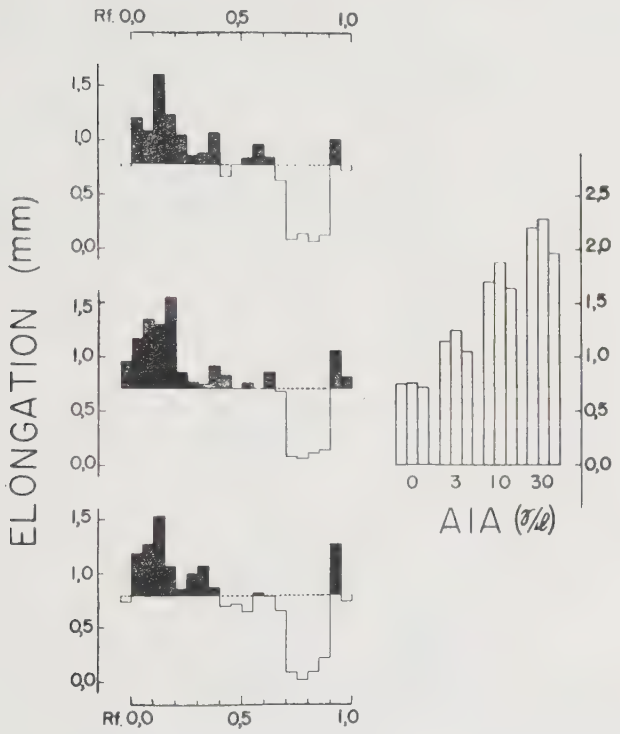


Fig. 2. — Histogrammes représentant l'activité des substances de croissance existant dans l'apex de chrysanthème « Honeysweet ». Chaque chromatogramme (dans de l'isopropanol à 80 %) a été effectué avec une quantité équivalant à 200 mg de matériel frais provenant du même extrait.

En abscisses : position sur les chromatogrammes. *En ordonnées* : élongation, au-delà de la longueur initiale des segments de mésocotyles d'avoine (chaque barre est la moyenne de 10 segments mesurant 4 mm au départ). L'élongation des témoins contenant 0, 3, 10 et 30 γ/l. d'AIA est représentée à droite.

10 mésocotyles par tube avec 3 γ/l. d'AIA mesurant (en mm) :

											$\bar{X}$
Tube I	5,0	5,1	5,3	5,4	4,6	5,4	5,6	5,2	5,2	4,7	5,15
Tube II	4,8	5,6	4,9	5,1	5,7	5,3	5,4	5,0	5,2	5,5	5,25
Tube III	4,9	5,3	4,9	4,7	4,8	5,3	4,7	5,7	5,3	4,9	5,05

$F = 1{,}0$ $\quad F^{2}_{27}\ (0{,}20) = 1{,}7$

10 mésocotyles par tube avec 10 γ/l. d'AIA mesurant (en mm) :

											$\bar{X}$
Tube I	6,0	6,3	5,8	5,6	5,8	5,6	6,0	6,0	5,9	5,8	5,88
Tube II	5,0	5,5	5,2	6,2	5,7	5,8	6,4	5,2	5,8	5,6	5,64
Tube III	5,5	5,8	5,7	5,5	5,1	5,5	5,5	5,7	6,0	6,7	5,70

$F = 1{,}1$ $\quad F^{2}_{27}\ (0{,}20) = 1{,}7$

10 mésocotyles par tube avec 30 γ/l. d'AIA mesurant (en mm) :

											$\bar{X}$
Tube I	6,9	5,7	6,1	5,7	6,2	6,0	6,0	5,9	7,1	6,4	6,20
Tube II	6,7	6,9	5,3	6,0	6,7	6,1	6,1	5,9	6,9	6,2	6,28
Tube III	6,0	6,9	5,8	5,9	6,2	5,7	5,6	5,8	5,9	5,8	5,96

$F = 1{,}3$ $F^2_{27}(0{,}20) = 1{,}7$

Puis nous avons calculé les coefficients de variation et degrés de précision de la moyenne pour le premier pic d'activité (Rf 0,0-0,2) de chacun des trois histogrammes montrés à la fig. 3. Dans ce cas, nous avions, au préalable, calculé l'activité biologique du pic en équivalents d'AIA.

L'activité de premier pic, calculée en équivalents d'AIA (γ/l.) est :

18,4 18,6 16,8

Moyenne $\bar{X} = 17{,}9$

Erreur standard : $s = \sqrt{\frac{\Sigma (x-\bar{x})^2}{(n-1)}} = 0{,}98$

Coefficient de variation : $\frac{s}{\bar{X}} \times 100 = 5{,}45\,\%$

Degré de précision de la moyenne :

$$s_m = \sqrt{\frac{\Sigma (x-\bar{x})^2}{n\,(n-1)}} = 0{,}57$$

à 95 % $\bar{X} \pm T\, s_m = 17{,}9 \pm 2{,}5$

Les calculs qui précèdent donnent une idée de la manière dont on peut procéder pour déterminer le degré de sûreté des résultats chromatographiques. L'exemple des trois chromatogrammes d'extrait de chrysanthème « Honeysweet » montre que les résultats sont reproductibles. Les calculs indiquent, en particulier, que l'activité de la zone comprise entre les Rf 0,0 et 0,2 est presque semblable dans les trois répétitions, bien qu'on ne puisse affirmer que cette zone englobe une ou deux substances différentes.

CHAPITRE VIII

VARIATIONS DES SUBSTANCES DE CROISSANCE CHEZ DES PLANTES DE JOURS LONGS

1. *RUDBECKIA SPECIOSA* WEND.

Toutes les plantes ont été cultivées dans une serre où la température était de 20°C à 25°C environ pendant la journée et de 16°C à 20°C pendant la nuit. Le lot de plantes de jours courts et celui de jours longs ont, tous deux, reçu 9 h. de lumière naturelle. Le reste du temps, soit de 17 h. à 8 h., les plantes étaient recouvertes de rideaux noirs sous lesquels étaient allumées des lampes incandescentes de 60 W. Ces lampes ont été installées tous les 150 cm,

à 60 cm au-dessus des plantes. Allumées pendant 9 h., à la fin de la période de jour naturel, elles permettaient de donner un total de 18 h. de lumière au lot de plantes de jours longs.

Les rudbeckias ont été cultivés en jours courts jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille suffisante. Après environ 4 mois de culture, on a transféré chaque semaine, pendant dix semaines, un lot de 10 plantes en jours longs, une onzième série restant en jours courts jusqu'à la fin de l'expérience. Chacun des onze lots reçut ainsi un nombre de jours courts variant de 0 à 10 semaines.

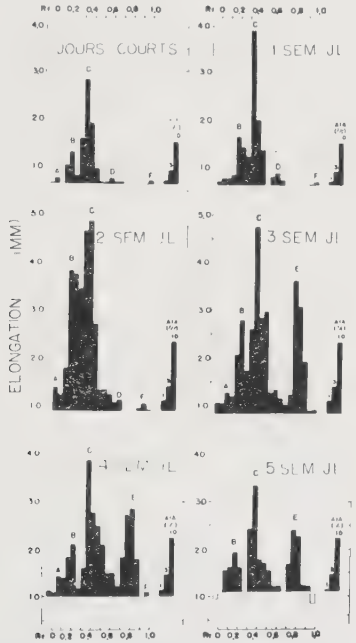


Fig. 3. — Histogrammes représentant la variation, au cours de l'induction florale, de l'activité des substances de croissance existant dans l'apex de *Rudbeckia speciosa*. Chaque chromatogramme a été effectué avec l'extrait de 50 mg de matériel sec et développé dans de l'isopropanol à 80 %.

En abscisses : position sur les chromatogrammes. *En ordonnées* : élongation, au-delà de la longueur initiale, des segments de mésocotyles d'avoine (chaque barre est la moyenne de 10 segments mesurant 4 mm au départ). L'élongation des témoins en présence de 1, 3 et 10 γ/l. d'AIA est représentée à droite de chacun des histogrammes. (D'après Harada et Nitsch, 1959 a).

Au bout de ces dix semaines, tous les bourgeons des plantes des onze lots furent récoltés et extraits, les extraits étant chromatographiés et les chromatogrammes testés comme il a été indiqué plus haut.

La fig. 3 montre les histogrammes que nous avons obtenus avec les extraits de rudbeckias ayant reçu les différents traitements photopériodiques. La hauteur des barres noires est proportionnelle à l'élongation des mésocotyles au-delà de celle des témoins.

Les histogrammes présentés ci-dessus montrent qu'il existe au moins 6 substances de croissance dans l'extrait méthanolique

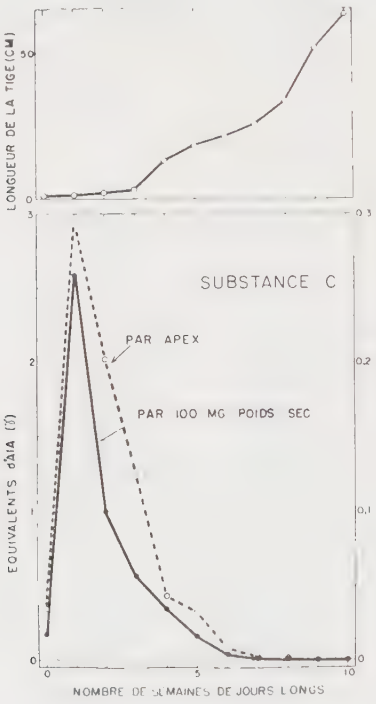


Fig. 4. — *En haut* : courbe de croissance de la tige principale de *Rudbeckia speciosa* en jours longs de 18 heures. *En bas* : variation de la teneur en substance C de *Rubdeckia speciosa* au cours de l'induction florale.

En abscisses : nombre de semaines de jours longs. *En ordonnées* : (*en haut*) longueur de la tige principale mesurée en cm, (*en bas*) concentration de substance C par 100 mg de matériel sec (traits pleins, ordonnées à gauche), ou par apex (lignes pointillées, ordonnées à droite), exprimée en γ d'acide-3-indolyl-acétique qui produiraient la même élongation des mésocotyles d'avoine. (D'après Harada et Nitsch, 1959 a).

du bourgeon apical de rudbeckia. Ces substances ont été appelées provisoirement : rudbeckia A, B, C, D, E et F.

Lorsqu'on les chromatographie en employant comme solvant de l'isopropanol à 80%, les valeurs de leur Rf sont les suivantes :

A : de 0,0 à 0,1 ; B : de 0,1 à 0,25 ; C : de 0,25 à 0,45 ; D : de 0,5 à 0,65 ; E : de 0,65 à 0,85 ; F : de 0,9 à 1,0.

Il semble que les substances A, D et F soient ou présentes en très faibles quantités ou très peu actives. Les substances B, C et E, au contraire, sont, soit très actives, soit très abondantes, car elles font remarquablement bien pousser les sections de mésocotyles.

Variations quantitatives des substances C, B et E.

Substance C :

Il suffit d'une semaine de jours longs pour décupler le niveau d'activité de cette substance par rapport aux plantes-témoins

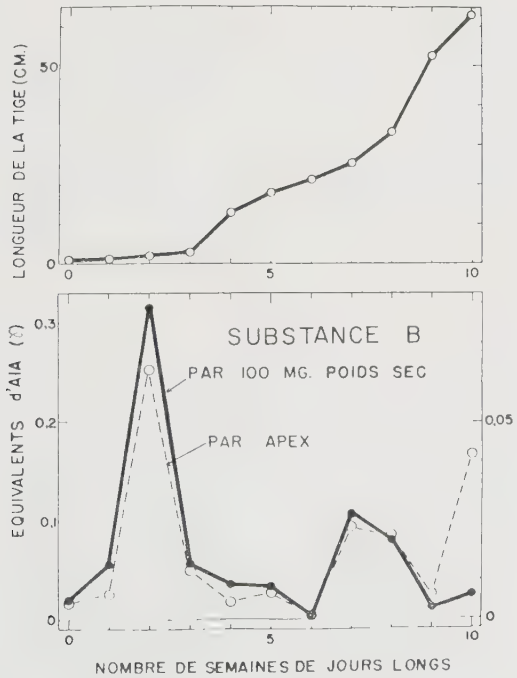


Fig. 5. — *En haut* : courbe de croissance de la tige principale de *Rudbeckia speciosa* en jours longs de 18 heures. *En bas* : variation de la teneur en substance B de *Rudbeckia speciosa* au cours de l'induction florale.

En abscisses : nombre de semaines de jours longs. *En ordonnées* : (*en haut*) longueur de la tige principale mesurée en cm, (*en bas*) concentration de substance B par 100 mg de matériel sec (traits pleins, ordonnées à gauche), ou par apex (lignes pointillées, ordonnées à droite), exprimée en γ d'acide 3-indolyl-acétique qui produiraient la même élongation des mésocotyles d'avoine. (D'après Harada et Nitsch, 1959 a).

restés en jours courts (fig. 4). Pourtant l'aspect extérieur de la plante n'a guère changé ; les rudbeckias sont toujours à l'état de rosettes, mais la couleur des feuilles est devenue plus claire et leur position est un peu plus verticale. Quant au méristème apical lui-même, il accuse un net gonflement et une augmentation de largeur.

Substance B :

A la fin de la deuxième semaine de jours longs, le niveau d'activité de la substance B atteint son maximum, soit environ

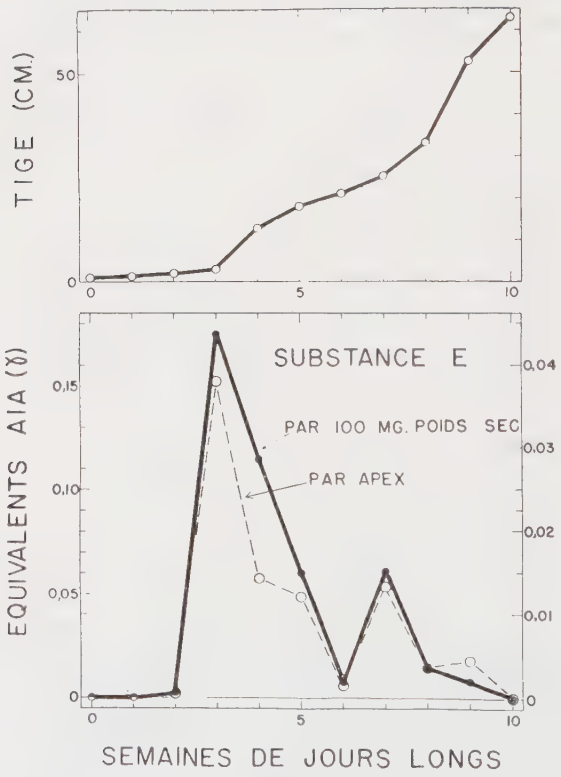


Fig. 6. — *En haut* : courbe de croissance de la tige principale de *Rudbeckia speciosa* en jours longs de 18 heures. *En bas* : variation de la teneur en substance E de *Rudbeckia speciosa* au cours de l'induction florale.

En abscisses : nombre de semaines de jours longs. *En ordonnées* : (*en haut*) longueur de la tige principale mesurée en cm, (*en bas*) concentration de substance E par 100 mg de matériel sec (traits pleins, ordonnées à gauche), ou par apex (lignes pointillées, ordonnées à droite), exprimée en γ d'acide 3-indolyl-acétique qui produiraient la même élongation des mésocotyles d'avoine. (D'après Harada et Nitsch, 1959 a).

10 fois l'activité du témoin resté en jours courts (fig. 5). L'aspect extérieur de la plante n'a toujours pas changé de manière notable par rapport au lot ayant reçu 1 semaine de jours longs et au lot témoin de plantes restées en jours courts. L'observation du méristème apical indique la différentiation de bractées.

Substance E :

Le premier signe extérieur de la « montée à fleur » se manifeste 3 semaines après le début de l'induction photopériodique sous forme d'un début de la croissance de la future hampe florale.

A ce même moment apparaît une nouvelle substance sur les chromatogrammes, la substance E (fig. 6). Cette concordance a un grand intérêt, car elle met en lumière, pour la première fois, la production d'une substance nouvelle au moment où la plante devient capable de fleurir et, plus particulièrement, au moment où elle est sur le point de passer du stade « rosette » à celui de « hampe florale ». Dans le méristème apical, ce stade correspond à l'initiation des fleurons les plus extérieurs du capitule.

La courbe de croissance de la tige de *Rudbeckia speciosa* montre qu'il existe deux périodes durant lesquelles l'élongation est rapide : l'une correspond à la « montée de la hampe florale », l'autre à la « croissance du pédoncule de l'inflorescence ». Toutes les deux sont précédées par une augmentation du niveau d'activité des substances B (fig. 5) et E (fig. 6).

2. *NICOTIANA SYLVESTRIS*.

Les plantes ont été cultivées en jours courts de 10 heures, jusqu'à ce qu'elles aient de 20 à 25 feuilles en rosette. Quatre mois environ après le semis, une partie de ces plantes a été placée en jours longs de 17 h., sauf une série qui a été conservée comme témoin. Les températures, dans les serres, variaient de 22° à 30°C le jour et de 17° à 22°C la nuit. Chaque semaine, pendant 5 semaines, les apex de 5 plantes ont été prélevés et extraits.

La fig. 7 montre les histogrammes obtenus avec les extraits d'apex de *Nicotiana sylvestris* ayant reçu 0, 1, 2, 3, 4, 5 semaines de jours longs. Ces histogrammes montrent la présence d'au moins 5 substances de croissance dans l'extrait méthanolique du bourgeon apical de *Nicotiana sylvestris*. Nous avons appelé, provisoirement, ces 5 substances : *N. sylvestris* A (0,0-0,1), B (0,1-0,2), C (0,25-0,4), D (0,4-0,55), E (0,55-0,8), par ordre de Rf croissants dans l'isopropanol à 80%.

Les substances A et D semblent soit être présentes en petites quantités, soit être peu actives, tandis que B, C et E sont soit assez actives, soit assez abondantes.

Après une semaine, le niveau d'activité de la substance B est déjà plus haut que celui du témoin resté en jours courts : à ce moment-là, on observe le gonflement et l'élargissement du méristème, mais l'aspect extérieur de la plante n'a pas encore visiblement changé. Il n'y a d'ailleurs guère plus de changement visible à la fin de la deuxième semaine de jours longs, c'est-à-dire au moment où le niveau d'activité de la substance B atteint son maximum (fig. 8). Ce stade correspond à l'initiation des sépales dans le méristème, l'initiation des pétales et des étamines se produisant une semaine plus tard.

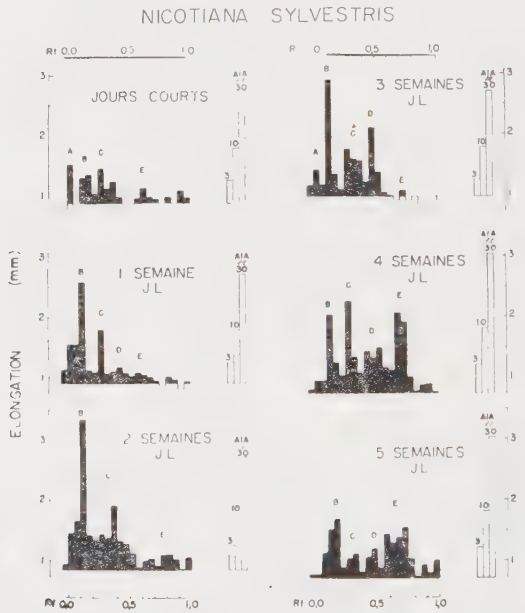


Fig. 7. — Histogrammes représentant la variation, au cours de l'induction florale, de l'activité des substances de croissance existant dans l'apex de *Nicotiana sylvestris*.

Chaque chromatogramme a été effectué avec 250 mg de matériel frais et développé dans de l'isopropanol à 80 %.

En abscisses : position sur les chromatogrammes. *En ordonnées* : élongation, au-delà de la longueur initiale, des segments de mésocotyles d'avoine (chaque barre est la moyenne de 10 segments mesurant 4 mm au départ). L'élongation des témoins en présence de 3, 10 et 30 γ/l. d'AIA est représentée à droite de chacun des histogrammes.

Quatre semaines après le début de l'induction photopériodique, les ébauches des premières fleurs sont complètes et on observe le premier signe d'une « montée à fleur », c'est-à-dire du passage du stade « rosette » à l'état « pré-inflorescentiel ». Ces

prémices correspondent à une brusque augmentation du niveau d'activité de la substance E, ce qui ressemble étonnamment au cas du rudbeckia (voir précédemment).

En résumé donc, chez les deux espèces de plantes de jours longs étudiées, *Rudbeckia speciosa* et *Nicotiana sylvestris*, nous

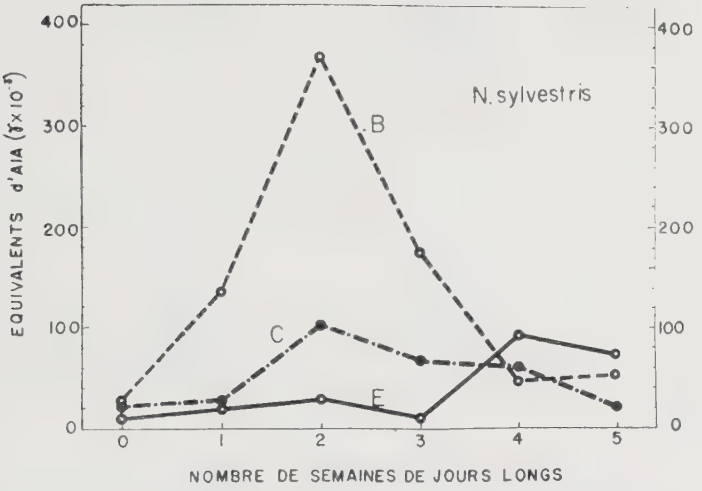


Fig. 9. — Variations des teneurs en substance B (traits discontinus), C (traits et points), E (traits pleins) de l'apex de *Nicotiana sylvestris* au cours de l'induction florale.

En abscisses : nombre de semaines de jours longs. *En ordonnées* : concentrations des substances pour 1 g de matériel frais exprimées en γ d'acide 3-indolyl-acétique qui produiraient la même élongation des mésocotyles d'avoine.

avons observé, après le passage du régime de jours courts au régime de jours longs, une augmentation brusque, au moment où la plante en rosette démarrait l'élongation de la hampe florale, d'une substance E, se trouvant à peu près à la même position sur les chromatogrammes des extraits des deux espèces.

CHAPITRE IX

VARIATIONS DES SUBSTANCES DE CROISSANCE CHEZ DES PLANTES DE JOURS COURTS

1. *NICOTIANA TABACUM*, VARIÉTÉ « MARYLAND MAMMOTH ».

Les plantes de cette expérience ont été cultivées dans les Super-serres du Phytotron à Gif où la longueur du jour était soit raccourcie automatiquement au moyen de rideaux métalliques qui obscurcissaient entièrement la serre à heures fixes, soit allongée au moyen d'un éclairage d'appoint. La température était de 20° à 25°C pendant la journée et de 15° à 20°C pendant la nuit. Jusqu'à ce que les plantes aient produit de 20 à 25 feuilles bien développées, la durée du jour a été maintenue à 16 heures, ce qui produisit un effet de « jours longs » et maintint cette variété de tabac à l'état végétatif.

Quatre mois après le semis, les plantes ont été transportées en jours courts de 10 heures, sauf une série restée en jours longs pour servir de témoin. A partir de cette date, et chaque semaine, les apex de 10 plantes ont été récoltés, extraits et les extraits chromatographiés.

La fig. 9 donne les histogrammes que nous avons obtenus avec chaque série, y compris la série témoin. Ces histogrammes montrent qu'il existe au moins 2 substances de croissance principales dans l'extrait méthanolique d'apex de tabac « Maryland Mammoth ».

Comme pour les autres plantes examinées, nous avons appelé ces substances Maryland Mammoth B (0,1-2,5) et E (0,5-0,75), les lettres correspondant aux Rf observés dans le mélange isopropanol (80%) : eau (20%). Ces 2 substances B et E semblent être très actives ou exister en assez grandes quantités dans la plante.

Bien que l'aspect extérieur de la plante n'ait guère changé après deux semaines de jours courts, on observe une forte augmentation du niveau d'activité de la substance B. Ce stade correspond à l'initiation des sépales dans le méristème, l'initiation des pétales et des étamines se produisant une semaine plus tard. Ce niveau élevé persiste une semaine plus tard, puis diminue 4 semaines après le début de l'induction photopériodique. C'est à ce moment-là que l'on observe les premiers signes macroscopiques de la formation des boutons floraux. Par contre, on n'observe pas de variations notables du niveau d'activité de la substance E dans ce cas, contrairement à ce qui se produit chez les plantes

de jours longs, ou, comme nous le verrons plus tard, chez le chrysanthème « Shuokan ».

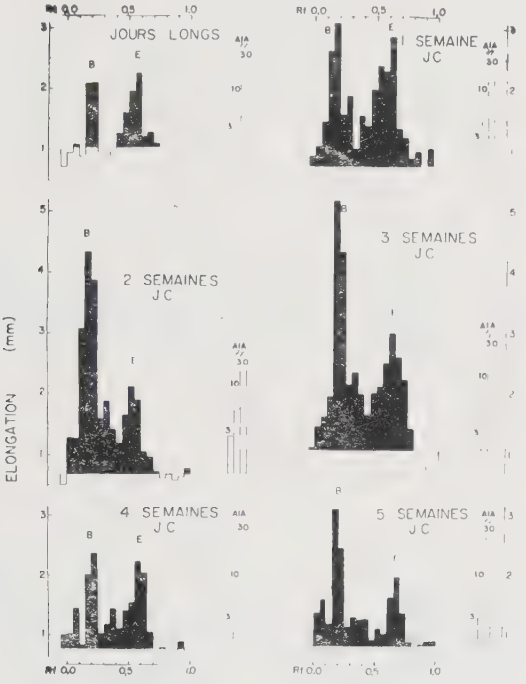


Fig. 9. — Histogrammes représentant les variations, au cours de l'induction florale, de l'activité des substances de croissance existant dans l'apex de *Nicotiana tabacum* (var. Maryland Mammoth). Chaque chromatogramme a été effectué avec 250 mg de matériel frais et développé dans de l'isopropanol à 80 %. Explications comme pour la fig. 7.

2. *CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM*, VARIÉTÉ « SHASTA ».

Des boutures bien uniformes furent élevées en jours longs de 18 h. Lorsqu'elles eurent atteint la taille de 15 cm environ, elles furent pincées, pour favoriser le départ de trois ou quatre nouvelles pousses latérales. Quand toutes ces nouvelles pousses eurent atteint un développement suffisant, les traitements par des jours courts furent commencés. Chaque semaine on plaça en jours courts un lot de quatorze plantes. Au bout de dix semaines on obtint ainsi dix lots ayant reçu de une à dix semaines de jours courts. Les apex de ces plantes furent récoltés séparément le même

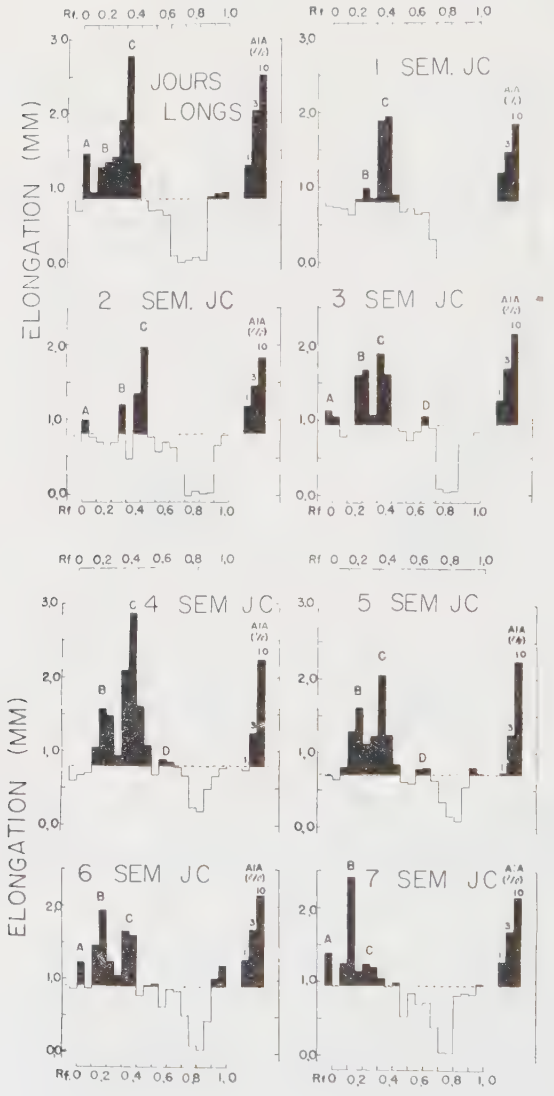


Fig. 10. — Histogrammes représentant les variations, au cours de l'induction florale, de l'activité des substances de croissance existant dans l'apex de chrysanthème « Shasta ».

Chaque chromatogramme a été effectué avec 50 mg de matériel sec et développé dans de l'isopropanol à 80 %.

Explications comme pour la fig. 3. (D'après Harada et Nitsch, 1959 a).

jour, ainsi que ceux du lot témoin demeuré en jours longs jusqu'à la récolte. (Jours longs et jours courts avaient été produits de la même façon que dans le cas des rudbeckias, les températures minimales étant de 20°C le jour et de 16°C la nuit).

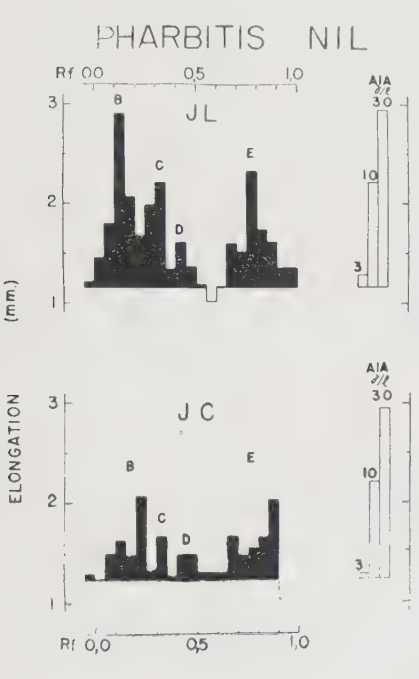


Fig. 11

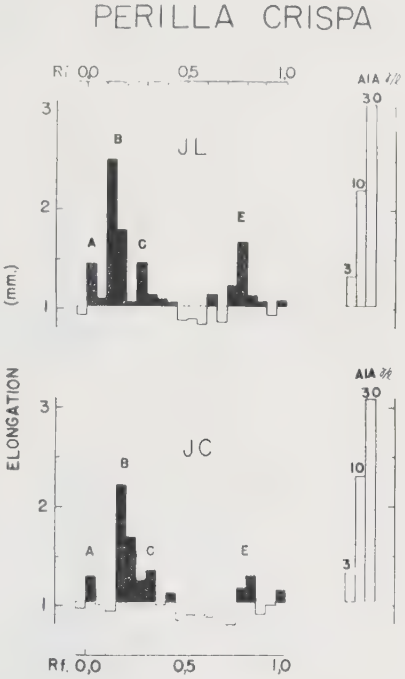


Fig. 12

Fig. 11. — Histogrammes représentant les niveaux de substances endogènes de croissance contenues dans 250 mg (poids frais) d'apex de *Pharbitis Nil*.
En haut : échantillon prélevé sur des plantes non induites (maintenues en jours longs de 17 heures). *En bas* : échantillon prélevé sur des plantes induites (après 3 semaines de jours courts).
Mêmes légendes que pour la fig. 7.

Fig. 12. — Histogrammes représentant l'activité biologique des chromatogrammes d'extraits de 250 mg (poids frais) d'apex de *Perilla crispa*.
En haut : échantillon prélevé sur des plantes non induites (maintenues en jours longs de 17 heures). *En bas* : échantillon prélevé sur des plantes induites (après 2 semaines de jours courts).
Mêmes légendes que pour la fig. 7.

Comme le montre la fig. 10, plusieurs substances existant dans l'extrait d'apex de chrysanthème « Shasta » ont provoqué l'élongation des mésocotyles. Leurs Rf dans le mélange isopropanol 80%+eau 20% sont les suivants : A : 0,0-0,1 ; B : 0,1-0,3 ; C :

0,3-0,4 ; D : 0,45-0,65. Une substance très toxique, qui souvent tue les mésocotyles, fut découverte dans la zone située entre les Rf 0,6 et 0,9 (dans l'isopropanol à 80%). Cette substance toxique

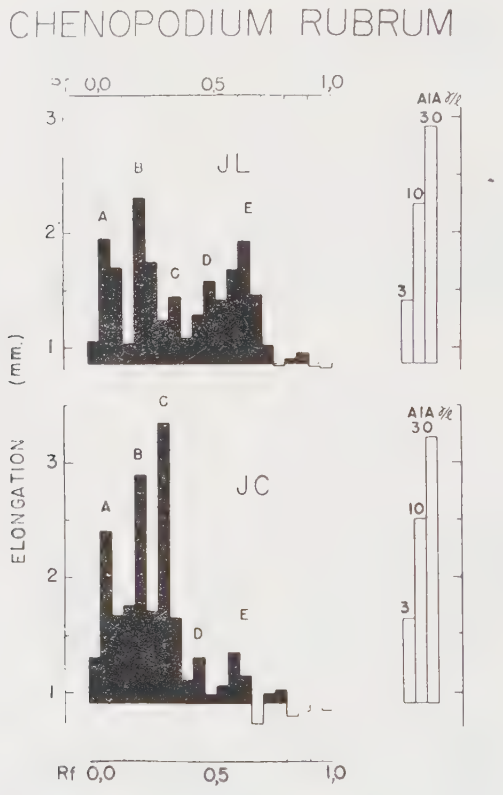


Fig. 13. — Histogrammes représentant l'activité biologique des chromatogrammes d'extraits de 250 mg (poids frais) d'apex de *Chenopodium rubrum*. *En haut* : échantillon prélevé sur des plantes non induites (maintenues en jours longs de 17 heures). *En bas* : échantillon prélevé sur des plantes induites (après une semaine de jours courts).
Mêmes légendes que pour la fig. 7.

pourrait masquer entièrement la présence d'une substance stimulant la croissance des mésocotyles à la position habituelle des substances E.

Plusieurs méthodes ont été essayées pour séparer cet inhibiteur des substances actives qu'il pouvait masquer : extraction

à l'éther de la solution aqueuse à des pH variables, absorption sur colonne d'alumine, méthode de fractionnement au bicarbonate (1). Avec cette dernière méthode, l'inhibiteur a pu être extrait par l'éther à partir de la fraction aqueuse à pH 8,0 : il fait donc partie de la fraction neutre, mais nous n'avons pu séparer ainsi de l'inhibiteur une substance de croissance qui migrerait dans la région des Rf 0,6-0,8 du chromatogramme. Toutefois l'existence d'une telle substance demeure possible.

3. *PHARBITIS NIL*, *PERILLA CRISPA* et *CHENOPODIUM RUBRUM*.

Les expériences faites sur *Pharbitis Nil* (2), et *Perilla crispa* montrent que les teneurs des substances E sont plus élevées en jours longs (17 h.) qu'en jours courts (10 h.). Il en est de même pour les substances B et C (fig. 11 et 12).

Dans le cas de *Chenopodium rubrum* (2), la teneur des substances D et E est aussi plus élevée en jours longs (17 h.) qu'en jours courts (10 h.), mais celle des substances A, B et C est plus basse (fig. 13).

En résumé, à part le cas du chrysanthème « Shasta » où une substance toxique empêchait la détection d'une substance E, nous avons observé la présence de substances actives migrant au Rf 0,55 - 0,80 pour chacune des plantes de jours courts suivantes : tabac « Maryland Mammoth », *Pharbitis Nil*, *Perilla crispa* et *Chenopodium rubrum*, chaque fois qu'elles étaient cultivées en jours longs. La présence d'une substance E serait donc liée plutôt au traitement « jours longs » qu'à l'induction de la floraison elle-même.

(1) L'extrait méthanolique est évaporé à sec puis repris par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (10 mg/cc) que l'on extrait ensuite 3 fois à l'éther déperoxydé. Cette fraction éthérée constitue la fraction neutre.

(2) Nous remercions vivement M. le Prof. NAKAYAMA pour les graines de *Pharbitis Nil* et le Dr CUMMING pour les graines de *Chenopodium rubrum* qu'ils ont bien voulu nous envoyer.

CHAPITRE X

VARIATIONS DES SUBSTANCES DE CROISSANCE CHEZ DES PLANTES NÉCESSITANT UN TRAITEMENT PAR LE FROID

1. *CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM*, VARIÉTÉ « SHUOKAN ».

Cinquante plantes uniformes provenant de boutures non vernalisées furent groupées en cinq lots qui furent soumis respectivement à 1, 2, 3 ou 4 semaines de traitement au froid à 1°C, le lot témoin restant à une température au-dessus de 16°C. Les

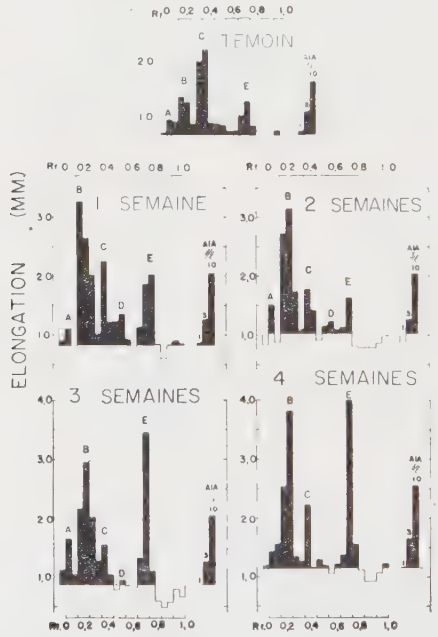


Fig. 14. — Histogrammes représentant la variation, au cours de la vernalisation, de l'activité des substances de croissance existant dans l'apex du chrysanthème « Shuokan ». Chaque chromatogramme a été effectué avec 25 mg de matériel sec et développé dans de l'isopropanol à 80 %. Légendes comme pour la fig. 3. (D'après Harada et Nitsch, 1959 a).

plantes reçurent le traitement par le froid pendant la nuit, (c'est-à-dire de 17 heures à 8 heures) en chambre froide, mais, pendant la journée, elles étaient replacées en serre où la température était

de 20° à 25°C. Les traitements au froid débutèrent simultanément pour les quatre lots, les apex étant prélevés à la fin de chaque traitement.

Plusieurs substances actives sur le test mésocotyle furent décelées et nommées provisoirement Shuokan A, B, C, D et E suivant leurs Rf comme dans le cas des autres plantes étudiées.

On peut voir sur la fig. 14 que les substances B, C et E sont les plus abondantes ou les plus actives. Notons que les Rf de ces

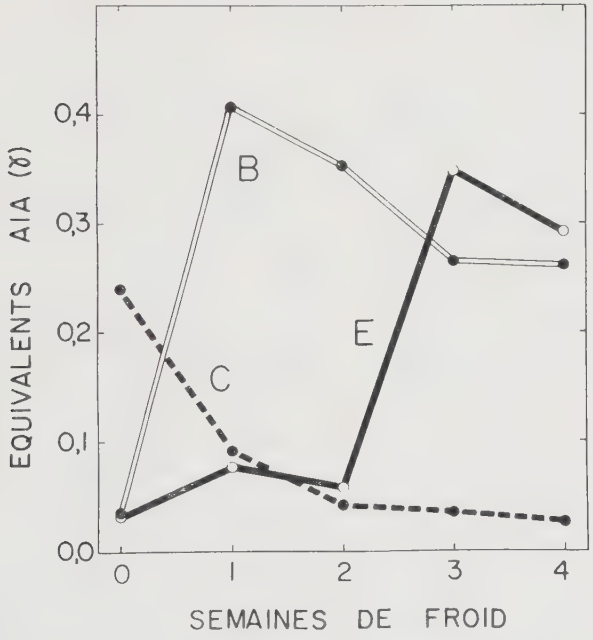


Fig. 15. — Variation de la concentration en substance B (double ligne), C (ligne pointillée), E (traits pleins) dans l'apex du chrysanthème « Shuokan » au cours de la vernalisation.

En abscisses : nombre de semaines de vernalisation. *En ordonnées* : concentration des substances dans 100 mg de matériel sec, exprimée en γ d'acide 3-indolyl-acétique qui produiraient la même élongation des mésocotyles d'avoine. (D'après Harada et Nitsch, 1959 a).

substances dans l'isopropanol à 80% sont pratiquement identiques aux Rf des substances correspondantes du rudbeckia, à savoir : B : 0,1-0,25 ; C : 0,25-0,4 ; E : 0,60-0,75.

Quand les chrysanthèmes « Shuokan » sont cultivés à des températures plus élevées (16°C au moins) ils restent à l'état de rosettes

végétatives pendant une période très longue (Harada et Nitsch, 1959 b). A ce stade l'apex contient relativement peu de substances de croissance. Au cours de la vernalisation, la concentration en substance C diminue, tandis que celle de B augmente : elle est déjà dix fois plus forte que celle du témoin après une semaine de vernalisation. Quant à l'activité de la substance E, ou sa concentration dans l'apex, elle est très faible dans les points végétatifs de plantes non vernalisées mais augmente brusquement après trois semaines de traitement par le froid, atteignant, alors une valeur environ dix fois plus forte que celle des témoins non vernalisés (fig. 15).

Dans une autre série d'expériences complémentaires, nous avons suivi les variations de l'activité biologique de chaque substance après la vernalisation. Quarante plantes très uniformes furent soumises au froid (3°C) pendant quatre semaines. Toutes les plantes furent ensuite transportées dans une serre où la température était de 22° à 30° C le jour est de 17° à 22° C la nuit, la durée du jour étant maintenue à 17 heures par un éclairage artificiel complétant la lumière naturelle. A la fin des 1re, 2e, 3e, 4e, 5e, 9e, 11e et 13e semaines, cinq apex furent prélevés, et les dosages des substances de croissance effectués sur ces échantillons. Au cours de cette série d'expériences, nous avons pu observer les changements dans l'activité d'au moins deux substances : B et E. La concentration de la substance E reste élevée dans l'apex jusqu'au moment où la plante commence à monter, c'est-à-dire jusqu'à deux semaines après la fin de la vernalisation, puis son activité décroît. On peut supposer que la plante commence à monter quand l'activité de la substance E atteint un certain niveau dans l'apex, et que cette substance s'épuise ensuite au cours de la montaison.

Chez le rudbeckia, comme l'indiquait la fig. 6, nous avons observé deux maxima dans la concentration de la substance B, l'un au départ de la montaison, l'autre au cours de l'élongation rapide du pédoncule floral. La substance B de « Shuokan » montre une tendance analogue. Entre la cinquième et la neuvième semaine après la fin de la vernalisation, c'est-à-dire, pendant la période où la tige s'allonge le plus rapidement, la concentration de la substance B est la plus élevée.

2. *ALTHAEA ROSEA*, VARIÉTÉ « FORDHOOK GIANT DOUBLE SCARLET ».

Les plantes expérimentales furent cultivées en plein air, au champ d'essais du Laboratoire du Phytotron. Les graines furent semées en mai dans des « Jiffy-pots » (pots en tourbe) et les plantules transplantées au champ en juin. Des apex pour le dosage des substances de croissance furent prélevés 3 fois : le 1er novem-

bre 1959, le 15 mars 1960 et le 29 mars 1960. Le premier échantillon correspond à des apex non vernalisés, le second à des apex vernalisés mais pas encore prêts pour la « montée à fleur », le dernier à des apex vernalisés et sur le point de « monter ».

La fig. 16 montre les histogrammes des extraits méthanoliques

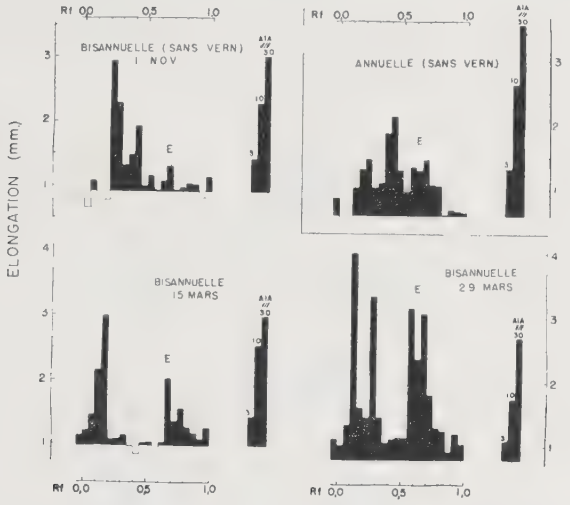


Fig. 16. — Histogrammes montrant les niveaux des substances endogènes (actives sur le test mésocotyle) contenues dans 250 mg (poids frais) d'apex de rose-trémière.

En haut, à gauche : échantillon prélevé sur des roses-trémières bisannuelles, variété « Fordhook Giant Double Scarlet » le 1er novembre 1959 (avant vernalisation).

En bas, à gauche : échantillon de la variété précédente prélevé le 15 mars 1960 (après vernalisation). *En bas, à droite* : échantillon de la variété précédente prélevé le 29 mars 1960 (après vernalisation, 2 semaines plus tard). *En haut, à droite* : échantillon prélevé sur des roses-trémières annuelles, variété « Indian Spring » sans traitement par le froid.

Légendes comme pour la fig. 7. (D'après Harada et Nitsch, 1961).

chromatographiés sur papier dans de l'isopropanol à 80%. Trois substances de croissance au moins ont été détectées par le test mésocotyle et dénommées : rose-trémière B (0,1-0,25), C (0,25-0,45) et E (0,55-0,75), selon leurs Rf. L'aspect morphologique de la plante n'a guère varié jusqu'à la fin d'avril, époque à laquelle les plantes commencèrent à monter à fleur ; mais le 15 mars, le niveau de l'activité de la substance E était plus haut que le 1er novembre et il continua de monter, comme le montre la fig. 17. La substance C s'est aussi accumulée dans l'apex juste avant que

la plante commence à monter, alors que la substance B maintenait un niveau à peu près constant pendant toute la durée de l'expérience. Les substances de croissance contenues dans la feuille sont les mêmes ; elles y sont en quantité plus réduites, mais leurs niveaux varient dans le même sens que celui des substances de croissance de l'apex : par exemple, le niveau d'activité de la substance E était plus élevé le 4 avril que le 22 mars (fig. 17).

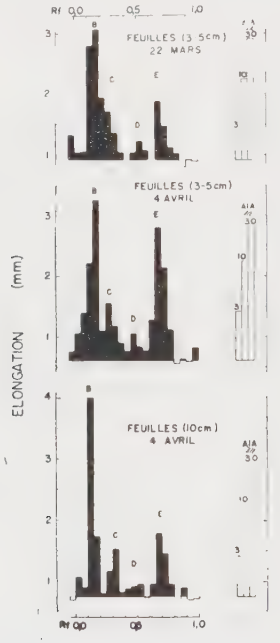


Fig. 17. — Histogrammes montrant les substances de croissance endogènes (actives sur le test mésocotyle) contenues dans 250 mg (poids frais) de feuilles fraîches de rose-trémière (var. Fordhook Giant Double Scarlet).

En haut : jeunes feuilles (limbes de 3-5 cm de longueur), prélevées le 22 mars. *Au centre* : jeunes feuilles (limbes de 3-5 cm de longueur), prélevées le 4 avril. *En bas* : feuilles âgées (limbes de plus de 10 cm de longueur) prélevées le 4 avril.

Légendes comme pour la fig. 7.

Nous avons aussi constaté que les jeunes feuilles contiennent plus de substance E que les feuilles âgées (fig. 17).

Une étude complémentaire a montré que les apex de roses-trémières annuelles, c'est-à-dire qui, semées au printemps, montent et fleurissent la même année sans vernalisation (la variété « Indian Spring » par exemple), contenaient, à côté d'autres substances de

croissance, une substance migrant au Rf 0,65 dans l'isopropanol à 80%. Ce Rf correspond à celui des substances E détectées dans le cas de la rose-trémière bisannuelle au début de la montaison (fig. 16).

En résumé, pour les deux espèces, nécessitant une vernalisation, qui ont été étudiées (chrysanthème « Shuokan » et rose-trémière bisannuelle), nous avons mis en évidence la production, en fin de vernalisation, d'une substance E qui atteint une concentration maximale au moment où la plante commence d'être apte à « monter ».

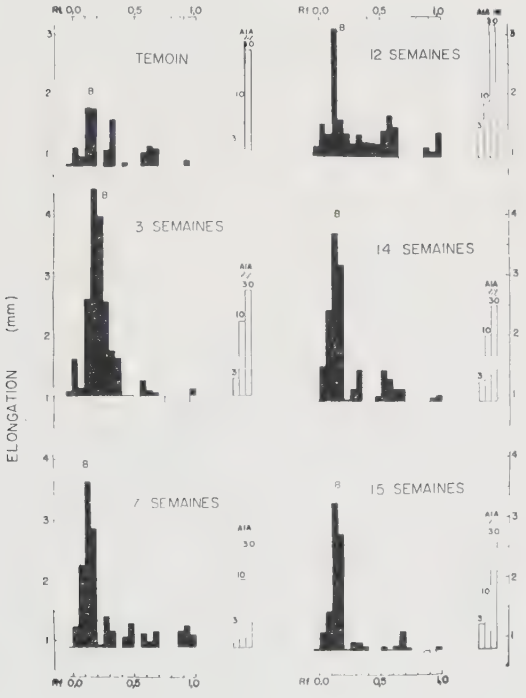


Fig. 18. — Histogrammes représentant la variation, après le traitement par l'acide gibbérellique, de l'activité des substances de croissance endogènes existant dans l'apex du chrysanthème « Shuokan ».

Chaque chromatogramme a été effectué avec 25 mg de matériel sec et développé dans de l'isopropanol à 80%.

Explications comme pour la fig. 7.

CHAPITRE XI

VARIATIONS DES SUBSTANCES DE CROISSANCE CHEZ DES PLANTES INDUITES A FLEURIR PAR L'ACIDE GIBBÉRELLIQUE

Les changements de régime photopériodique ou les traitements par le froid ne sont pas les seuls moyens d'induire la floraison chez une plante végétative. Depuis quelques années on sait que l'acide gibbérellique est capable de produire ce résultat chez certaines espèces. On peut se demander alors, comme nous l'avons fait dans la II[e] Partie, si l'AG cause la floraison en participant directement au mécanisme d'induction florale ou si, au contraire, il provoque la synthèse dans la plante d'une substance de flo-

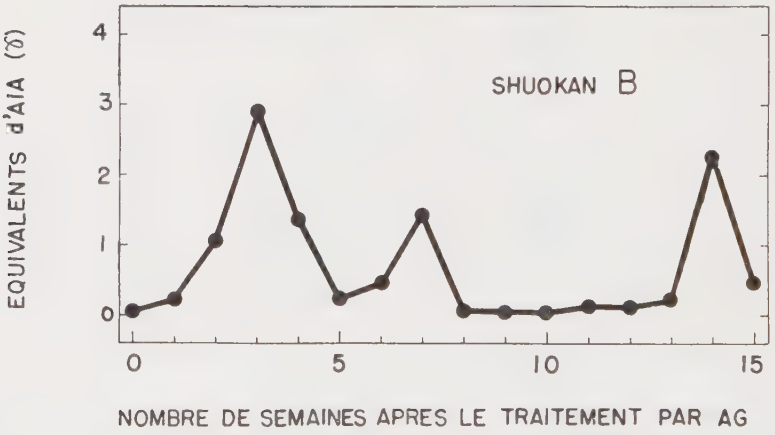


Fig. 19. — Variation de la teneur en substance B du chrysanthème « Shuokan » après le traitement par l'acide gibbérellique.
En abscisses : nombre de semaines après le traitement par l'acide gibbérellique. *En ordonnées* : concentration de la substance B pour 100 mg de matériel sec exprimée en γ d'acide 3-indolyl-acétique qui produiraient la même élongation des mésocotyles d'avoine.

raison spécifique. Il nous a donc paru utile de suivre les changements des substances de croissance endogènes au cours de l'induction florale produite par l'acide gibbérellique.

Pour cela, nous avons employé la variété de chrysanthème « Shuokan » qui peut être induite à fleurir par l'AG en l'absence de toute vernalisation (Harada et Nitsch, 1959 b). Nous avons

traité avec une pâte à la lanoline (10 mg d'AG par gr. de pâte) 80 plantes uniformes non vernalisées. Cent mg de cette pâte furent appliqués sur les surfaces inférieures de plusieurs feuilles de chacune des plantes. A la fin de chaque semaine, nous avons prélevé les apex de cinq plantes traitées et déterminé au moyen du test habituel le niveau des substances de croissance contenues dans ces apex. Les résultats obtenus après chromatographie se trouvent consignés dans la fig. 18. L'AG cause une élongation de la tige avant la floraison. Au cours de cette élongation le niveau de la substance B (Rf 0,1-0,25) varie (fig. 19), son activité étant plus grande au moment où celle-ci croît le plus vite. Par contre, l'activité de la substance E est restée presque inappréciable tout au long de l'expérience, ce qui laisserait à penser que l'acide gibbérellique agit sur la floraison par des processus différents de ceux déterminés par la vernalisation, c'est-à-dire qu'il ne déclenche pas la production de substances E comme le fait le froid.

CHAPITRE XII

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats présentés dans la Troisième Partie apportent de nouvelles preuves à l'idée que des changements profonds dans les niveaux des substances de croissance endogènes ont lieu au cours de l'induction florale. Ces changements sont non seulement quantitatifs mais aussi qualitatifs.

Les nombreux exemples qui ont été donnés plus haut peuvent être réunis en deux groupes principaux : celui des plantes de jours longs et de celles nécessitant une vernalisation, d'une part, et celui des espèces de jours courts, d'autre part. Examinons les traits principaux de ces deux groupes.

1. Le cas des plantes de jours longs et de celles nécessitant une vernalisation.

Aussitôt après le début du traitement inductif, l'importance relative des substances de croissance endogènes se modifie. Quand les plantes sont prêtes à monter à fleur, une nouvelle substance apparaît dans l'extrait méthanolique d'apex. Chez le chrysanthème « Shuokan », le niveau d'activité de la substance E commence d'augmenter 3 semaines après le début du traitement par le froid. Ce niveau ne change pas d'une manière très significative pendant 2 semaines, mais baisse ensuite. Le maximum d'activité de E correspond au moment où la plante commence d'être apte à « monter ».

Dans le cas de la rose-trémière, le niveau d'activité de la

substance E augmente 1 mois après le début du traitement par le froid naturel, pour atteindre son maximum lorsque la plante est apte à former sa hampe florale. Nous constatons le même tendance chez les feuilles, surtout les plus jeunes. Notons que les augmentations brusques des niveaux de substance E chez le rudbeckia, le chrysanthème « Shuokan », la rose-trémière et le *N. sylvestris* ont lieu une ou deux semaines avant l'apparition des phénomènes visibles de « montée à fleur ».

Il semble donc vraisemblable d'admettre que ces substances E sont la cause plutôt que la conséquence de ce phénomène. Une autre observation pourrait confirmer cette corrélation ; le chrysanthème « Shuokan » est capable de monter à fleur même sans traitement vernalisant après une très longue période (Harada et Nitsch, 1959 b) ; cette montée est alors très lente. Or, chez cette plante, la substance E existe en petite quantité même avant la vernalisation ; elle agirait lentement dans ce cas et serait la cause de cette floraison tardive.

Nous pouvons observer quelques ressemblances entre les histogrammes de rudbeckia et ceux de « Shuokan ». Dans les deux cas, les substances principales présentent des positions semblables sur les chromatogrammes, et leurs changements quantitatifs suivent la même suite d'étapes. Les substances C (après le pic initial produit par des jours longs chez rudbeckia), diminuent progressivement, les substances B augmentent puis diminuent, et les substances E apparaissent juste avant la « montée à fleur ». Ces ressemblances entre les changements successifs des substances de croissance chez les plantes de jours longs et chez celles qui ont besoin de froid pour fleurir sont à rapprocher d'autres ressemblances physiologiques entre ces deux types de plantes. Parmi ces ressemblances, nous pouvons mentionner le fait que l'acide gibbérellique est capable de provoquer l'induction florale chez le rudbeckia comme chez le chrysanthème « Shuokan ».

Reinhard et Lang (1961) travaillant sur 2 variétés de *Hyoscyamus*, l'une de jours longs, l'autre nécessitant un traitement par le froid pour fleurir, ont aussi constaté un changement qualitatif et quantitatif des gibbérellines endogènes de ces deux espèces. Ces changements coïncident avec l'aptitude qu'a alors la plante à fleurir. Cette expérience confirme très bien les nôtres.

Konishi (1956) travaillant sur *Silene* (plante de jours longs) a constaté que, lors de la période d'induction, la production d'auxine était plus forte et que la capacité de la plante à la détruire était plus faible que chez la plante à l'état végétatif.

2. Le cas des plantes de jours courts.

Dans le cas du tabac « Maryland Mammoth », plante de jours

courts, la substance E existe toujours à l'état endogène, dans la plante induite comme dans la plante non induite. Sa variation au cours de l'induction photopériodique n'est pas très marquée.

Chez *Pharbitis,* on constate que les substances B. C et E ont un niveau d'activité plus important avant l'induction photopériodique que lorsque la plante se trouve induite.

Au moment de l'épanouissement des fleurs, les niveaux des substances endogènes seraient au point, le plus bas. C'est ce qu'a constaté Murakami (1961) en suivant le niveau de l'activité des gibbérellines endogènes au cours de la formation de la graine de *Pharbitis*, le niveau d'activité de trois substances de croissance (qui seraient 3 gibbérellines), augmentant pour atteindre son maximum 13 jours après la pollinisation.

Dans le cas de *Chenopodium*, nous constatons aussi une diminution du niveau de l'activité des substances D et E dans la photopériode inductive, tandis que les niveaux de l'activité des substances A, B et C augmentent.

Chez *Perilla*, nous constatons que la substance B a un niveau d'activité plus haut avant l'induction photopériodique que 2 semaines après le début du traitement de jours courts. Zhdanova (1945) a aussi constaté dans les feuilles de *Perilla* que le niveau d'activité des auxines baissait au cours de l'induction photopériodique. Leopold (1949) chez *Coleus* et Cooke (1954) chez *Soja*, var. « Biloxi » et *Xanthium italicum*, ont observé des différences d'activités analogues à celles que nous avons constatées.

Par contre, Vlitos et coll. (1954) travaillant sur *Soja* (var. Biloxi et Lincoln) et le tabac « Maryland Mammoth » trouvent des quantités plus importantes de ce qu'ils pensent être l'acide 3-indolyl-pyruvique lorsque les plantes sont exposées à une photopériode inductive, qu'avant cette induction.

Le sens des variations des substances de croissance endogènes est donc beaucoup moins clair chez les plantes de jours courts que chez celles de jours longs ou celles nécessitant une vernalisation.

3. Le cas de l'induction florale par l'acide gibbérellique

L'acide gibbérellique, comme le traitement par le froid, peut causer la floraison du chrysanthème « Shuokan ». Dans le premier cas, cependant, on n'observe pas les changements dans la concentration de la substance E que l'on observe après la vernalisation. La plante réagit différemment, bien que les deux processus conduisent au même résultat, c'est-à-dire à la floraison.

En résumé, il semble que les variations de l'activité de la substance E soit caractéristique du métabolisme de « jours longs » ou de celui des plantes vernalisées. Il serait important de l'isoler et d'en étudier les propriétés.

QUATRIÈME PARTIE

ÉTUDE DES SUBSTANCES « E »

Les résultats qui précèdent ont mis en lumière, chez les plantes de jours longs et celles nécessitant une vernalisation, la formation de substances biologiquement actives, migrant au Rf 0,60-0,80 en chromatographie ascendante dans l'isopropanol à 80%. Qu'il s'agisse de *Rudbeckia speciosa*, de *Nicotiana sylvestris*, du chrysanthème « Shuokan » ou de la rose-trémière bisannuelle, nous avons toujours constaté une correspondance entre l'apparition, sur les chromatogrammes, des pics de substance E et le moment où la plante devenait capable de « monter ». Une étude détaillée de ces substances s'imposait donc. Nous l'avons entreprise dans trois cas : celui du rudbeckia, du chrysanthème « Shuokan » et de la rose-trémière. Dans les deux premiers cas, nous nous sommes bornés à extraire assez de substance E pour en étudier certaines propriétés biologiques. Dans le cas de la rose-trémière, nous sommes allés plus loin : nous avons isolé et cristallisé cette substance puis étudié certaines de ses propriétés physico-chimiques et biologiques.

CHAPITRE XIII

LES TESTS BIOLOGIQUES

Pour alléger la lecture des résultats, nous avons consigné dans ce chapitre les techniques auxquelles nous avons fait appel pour l'étude des propriétés biologiques des substances E.

1. Le test *Avena*

Il s'agit du test classique de Went (1928) qui se trouve décrit en détail dans le livre de Went et Thimann (1937). Il est donc inutile de répéter ici la technique. Rappelons seulement que ce test est très spécifique des substances du type auxine et, tout spécialement, des auxines du type acide 3-indolyl-acétique. En particulier, ce test est insensible aux gibbérellines.

2. Le test topinambour

Les méthodes employées ont été décrites (Nitsch et Nitsch, 1956 b). Des fragments pesant 20 mg ± 1 mg (poids frais) au départ, prélevés dans le parenchyme vasculaire de tubercules de topinambour, clône P 17, sont ensemencés aseptiquement sur un milieu de base N_2 (1) contenant des oligoéléments (2) (1 cc/l.), du chlorhydrate de thiamine (10 mg l.) du citrate ferrique (10 mg l.), 2% de glucose, 0,8% de gélose (Difco Bacto Agar). A ce milieu de base, on ajoute les extraits à étudier, la stérilisation se faisant, soit par filtration sur membrane Millipore (Nitsch et Nitsch, 1957), soit par autoclavage. Le pH a toujours été ajusté à 5,5 avant autoclavage (20 minutes à 115°C).

Au bout de 5 semaines de croissance, à 25°C environ et à l'obscurité, on pèse les cultures, chaque résultat mumérique étant la moyenne de 12 cultures. Si l'extrait ajouté au milieu contient une auxine, on observe une prolifération des cellules et un accroissement de poids. Au contraire, toutes les neuf gibbérellines connues à ce jour sont sans action sur ce test, ainsi que l'ont montré J. P. et C. Nitsch (1962).

3. Test d'enracinement

Ce test a été mis au point par Hess (1957, 1961) dans son étude sur les substances capables de provoquer l'apparition de racines sur les boutures de *Hedera helix* L.

Cinq jours après leur germination à l'obscurité totale et à 25°C, des plantules de *Phaseolus aureus* Roxb. sont décapitées de façon à éliminer les cotylédons et la partie courbée d'hypocotyle située immédiatement au-dessous de ceux-ci. Vingt-quatre heures après cette opération, des segments d'hypocotyle de 7 cm de long sont prélevés à partir du sommet décapité, lavés une heure par trempage de la base dans de l'eau distillée, puis groupés par lots de 10. Chaque lot est alors placé dans un tube de 25 mm de diamètre, la base trempant dans 2 cc de la solution étudiée. On compte le nombre de racines qui apparaissent après 5 jours de croissance à l'obscurité. Ce test réagit aux auxines et à certains cofacteurs d'enracinement mais non pas aux gibbérellines.

4. Le test « maïs nain »

Le test « maïs nain », mis au point par Phinney (1956), met à profit des lignées de maïs dont le nanisme est sous la dépen-

(1) Même composition que la solution N_1 (Nitsch et Nitsch 1956 b) mais avec remplacement des 250 mg/l. de phosphate monosodique par 125 mg/l. d'hexametaphosphate de sodium.

(2) H_3BO_3 (5 mg/l.), $Mn\,SO_4 . 4H_2O$ (20 mg/l.), $Zn\,SO_4 . 7H_2O$ (8 mg/l.), KI (0,75 mg/l.), $Cu\,SO_4 . 5H_2O$ (0,02 mg/l.), $Na_2\,MoO_4 . 2H_2O$ (0,25 mg/l.).

dance d'un seul gène. Le nanisme d'origine génétique de ces plantes est levée par l'application de substances du type gibbérelline, les lignées ayant entre elles des sensibilités différentes suivant les substances administrées. Nous avons employé trois types de mutants, appelés « Dwarf-1 », Dwarf-3 » et « Dwarf-5 », provenant originellement du Prof. B.O. Phinney. Le gène dont dépend le nanisme étant récessif on n'obtient donc qu'un quart de plantules naines dans une population.

Huit jours après l'ensemencement, on élimine les plantules phénotypiquement normales et on prépare des lots de dix plantes naines chacun. On introduit alors dans le cœur de chaque plantule 0,1 cc des solutions à tester contenant 0,1% de « Tween 80 » comme mouillant et des doses croissantes d'AG (10 γ/l., 30 γ/l., 100 γ/l.) ou de substances E. Huit à dix jours après, on mesure les longueurs des gaines des premières et deuxièmes feuilles. La longueur de ces gaines est proportionnelle à la concentration en gibbérelline.

Ainsi que l'ont montré Phinney (1961) et J. P. et C. Nitsch (1962), l'ordre de sensibilité des trois mutants de maïs n'est pas le même pour les neuf gibbérellines. Cette différence peut donner des indications sur l'identité de la gibbérelline considérée.

5. Le test de germination des graines de laitue

Les graines de laitue de la variété « Grand Rapids » ont normalement besoin de lumière pour germer. L'acide gibbérellique, cependant, peut provoquer leur germination à l'obscurité totale (Kahn et coll., 1957, Skinner et coll. 1958, Haber and Tolbert 1959, Ikuma and Thimann 1960). Dans ces conditions, la germination des graines de cette variété de laitue peut donc servir à détecter des gibbérellines.

Pour le test, on dispose des lots de 100 graines dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre sur du papier filtre imbibé avec 10 cc de la solution à étudier (produit dissout dans de l'eau distillée).

Dans le cas des substances E de rudbeckia ou de « Shuokan », les parties correspondantes des chromatogrammes ont été découpées en petits morceaux lesquels ont été placés entre deux rondelles de papier filtre sans élution préalable. Pour tester la substance E de la rose-trémière, nous n'avons employé que 5 cc de liquide. Après incubation à 25°C et à l'obscurité totale pendant 3-5 jours, on détermine le pourcentage de germination. L'absence de toute lumière, en particulier de toute lumière rouge, est très importante, car des traces de radiations rouges agissent synergiquement avec des « kinétines », telle que la 6-furfuly-laminopurine, pour déclancher la germination. Dans les conditions de nos expériences, l'effet

de l'AG sur la germination se faisant sentir à partir de la concentration de 10 γ/l.

6. Test de skoog modifié.

Ce test, dérivé de celui de Skoog (Jablonski et Skoog, 1954), a été mis au point par Nitsch (1961) pour détecter des substances du type kinine dans de petites quantités d'extrait. Par contre, les gibbérellines n'ont pas d'action sur ce test

On prélève des morceaux de tiges dans la partie médiane de plants de tabac vigoureux, var. « Wisconsin 38 ». On stérilise ces morceaux 20 minutes dans une solution à 7% de $Ca(ClO)_2$. On prélève ensuite aseptiquement la moëlle des entrenœuds au moyen d'un trocard de 7 mm de diamètre. Les cylindres de moëlle ainsi obtenus sont coupés en tronçons de 1 cm de long, chaque tronçon étant ensuite fendu dans le sens de la longeur en deux parties égales. Chaque morceau est placé dans un tube (160 mm × 16 mm) stérilisé par un séjour de 20 minutes à l'autoclave (à 115°C) et contenant 2 cc d'une solution minérale (1), des oligoéléments (2) (1 cc/l.), du citrate ferrique (1 mg/l.), du glucose (2%), de l'AIA (1 mg/l.), du chlorhdyrate de thiamine (10 mg l.) et les substances à étudier. On n'immerge pas les explantats dans la solution, mais on les dépose sur la partie supérieure de rectangles de papier Whatman 3 MM (1 × 4 cm) qui maintiennent les cultures hors du liquide tout en permettant l'accès aux cellules des éléments nutritifs. Les tubes sont placés sur des supports inclinés. Après 5 semaines de culture dans une chambre à 25°-30°C recevant 18 heures de lumière artificielle, nous avons observé le degré de prolifération des cultures et déterminé leur poids.

7. Test de floraison

Il consiste essentiellement à faire fleurir, au moyen d'application de substances chimiques, des plantes maintenues dans des conditions non inductives.

Deux méthodes ont été utilisées pour introduire les substances E dans ces plantes : l'injection de solutions dans les pétioles des jeunes feuilles et l'application de pâte à la lanoline.

Dans le premier cas, des solutions correspondant à des quantités connues d'extrait ont été introduites dans les pétioles de jeunes feuilles au moyen d'une seringue, chaque plante traitée recevant en tout 0,05 cc à 0,1 cc de la solution par traitement réparti dans plusieurs pétioles. Dans la plupart des cas, les plantes

(1) $Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$ (0,5 g/l.), KNO_3 (125 mg/l.), $MgSO_4 . 7H_2O$ (125 mg/l.), HK_2PO_4 (125 mg/l.).

(2) Voir le test topinambour.

ont été traitées 3 fois par semaine, pendant 4 semaines. D'autres lots ont été traités de même avec de l'eau distillée ou des solutions aqueuses d'AG.

Dans le second cas, nous avons préparé une pâte à la lanoline en malaxant une partie de solution correspondant à des quantités connues d'extrait avec deux parties de lanoline.

Nous avons déposé de 30 à 50 mg de cette pâte par plante soit sur l'apex, soit sous les limbes des jeunes feuilles, soit à l'extrémité des pétioles jeunes après élimination du limbe. Les plantes ont été traitées de cette façon durant 4 semaines, à raison d'une application de pâte par semaine.

Des lots témoins ont été traités avec des pâtes renfermant soit de l'eau distillée, soit des quantités connues d'AG.

Après un délai plus ou moins long, suivant les cas, nous avons déterminé le pourcentage des plantes présentant des fleurs épanouies.

En résumé, nous avons fait appel à plusieurs sortes de tests :

a) un test permettant à la fois la détection d'auxines et de gibbérellines : le test mésocotyle.

b) trois tests qui donnent des résultats positifs avec les auxines, négatifs avec les gibbérellines ; le test *Avena*, le test topinambour et un test d'enracinement,

c) deux tests donnant des résultats positifs avec les gibbérellines, négatifs avec les auxines : le test maïs nain et le test de germination des graines de laitue,

d) un test de « kinines » : le test de Skoog modifié,

e) un test de floraison.

Grâce à la conjonction de ces divers tests il doit être possible de préciser les propriétés biologiques des substances E.

CHAPITRE XIV

LA SUBSTANCE E DU *RUDBECKIA SPECIOSA*

1. Extraction et purification.

Après la lyophilisation des apex induits par 3 semaines de jours longs, la poudre obtenue a été extraite au méthanol absolu à 0°C, et les extraits chromatographiés en chromatographie ascendante sur papier Whatmann 3 MM dans de l'isopropanol à 80%. La partie des chromatogrammes correspondant à la position de la substance E (Rf 0,65 à 0,85) a été découpée et éluée au méthanol. Après évaporation du méthanol, les extraits secs ont été conservés à —25°C.

2. Action sur la première feuille d'avoine

La croissance de la première feuille des plantules d'avoine est stimulée par l'acide gibbérellique. Cette propriété a été mise à profit par plusieurs expérimentateurs pour doser les gibbérellines (Overbeek et coll., 1957). Nous avons employé une technique analogue (Nitsch, non publié).

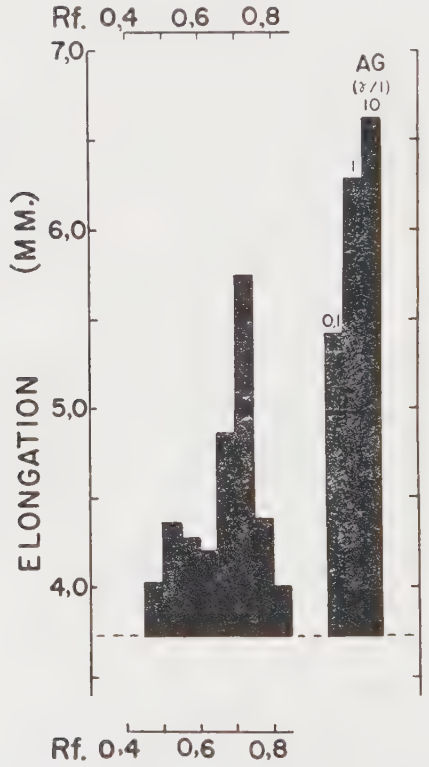


Fig. 20. — Effet de la substance E de *Rudbeckia speciosa* sur le test d'élongation de la première feuille d'avoine.

Le chromatogramme a été effectué avec la fraction acide d'un extrait provenant de 200 mg (poids sec) d'apex de rudbeckia induits (après 3 semaines de jours longs) et développé dans de l'isopropanol à 80 %.

En abscisses : position sur le chromatogramme. *En ordonnées* : élongation au-delà de la longueur initiale des segments de premières feuilles d'avoine (chaque barre est la moyenne de 10 segments mesurant 4 mm au départ). L'élongation des témoins en présence de 0,1, 1 et 10 γ/l. d'acide gibbérellique est représentée par des barres à la droite de l'histogramme.

On prépare des plantules d'avoine comme pour le test *Avena*, c'est-à-dire en les irradiant avec de la lumière rouge. On prélève un segment de feuille de 4 mm de long à 4 mm au-dessus du nœud

Ces segments de feuilles sont alors incubés avec l'extrait à étudier ou des fragments de chromatogramme et l'élongation mesurée après 24 heures.

La fig. 20 donne un résultat obtenu avec un fragment de chromatogramme de la fraction acide d'un extrait de rudbeckia induit. On voit, à l'endroit du Rf de la substance E un pic net d'activité. Ce résultat est une première indication que la substance E possède des propriétés biologiques semblables à celles de l'acide gibbérellique.

TABLEAU II

Effet de l'acide gibbérellique et de la substance E de Rudbeckia speciosa *sur l'allongement des gaines de plantules de maïs « Dwarf-1 ».*

Traitements (1)	Longueurs (en cm) (2)		
	1re gaine (I)	2e gaine (II)	Total (I)+(II)
H_2O.....	1,86	2,56	4,42±0,32*
Acide gibbérellique :			
10 γ/l.	1,94	2,79	4,83±0,21
30 γ/l. ..	2,34	3,46	5,80±0,22
100 γ/l.	2,88	4,12	7,00±0,35
Substances E (3) ..	2,22	3,42	5,64±0,14
Substance E (4) ...	2,80	4,03	6,83±0,39
Maïs normal	6,14	9,92	16,06±0,74

(1) 0,1 cc de solution aqueuse par plantule. Toutes les solutions, y compris l'H_2O de la série témoin, contenaient 0,1 % de « Tween 80 ».

(2) Chaque chiffre est la moyenne de 10 plantes mesurées 10 jours après le traitement.

(3) Substance E provenant de 250 mg d'apex (poids sec) prélevés après 3 semaines de jours longs.

(4) Substance E provenant de 500 mg d'apex (poids sec) prélevés après 3 semaines de jours longs.

(*) Erreur standard de la moyenne.

3. Action sur le test « maïs nain »

La difficulté de récolter assez de substance E de *Rudbeckia speciosa* ne nous a pas permis d'essayer cette substance sur les 3 mutants de maïs nain indiqués plus haut, mais seulement sur la variété « Dwarf-1 ». La substance E s'est montrée active sur ce test, l'extrait de 250 mg (poids sec) d'apex induits ayant un effet comparable à celui d'une solution de 23 γ/l. d'AG et 500 mg un effet comparable à celui de 83 γ/l. d'AG (Tableau II). Ces résultats positifs, obtenus avec un test considéré comme tout à fait spécifique des gibbérellines, indiquent que la substance E de rudbeckia a des propriétés nettes de gibbérelline. Le test maïs-nain a pu confirmer également l'absence de substance E dans les apex non induits (Tableau III).

TABLEAU III

Effet de l'extrait d'apex de Rudbeckia speciosa *et de chrysanthème « Shuokan »* non induits *sur l'allongement des gaines de plantules de maïs « Dwarf-1».*

Traitements (1)	Longueurs (en cm) (2)		
	1re gaine (I)	2e gaine (II)	Total (I)+(II)
H_2O.....	2,03	2,84	4,87±0,09*
Rudbeckia (3)	2,05	2,78	4,83±0,10
Shuokan (3)	2,06	2,74	4,80±0,07

(1) 0,1 cc de solution aqueuse par plantule.

Toutes les solutions, y compris l'H_2O de la série témoin, contenaient 0,1 % de « Tween 80 ».

(2) Chaque chiffre est la moyenne de 10 plantes mesurées 10 jours après le traitement.

(3) L'extrait provenant de 500 mg (poids sec) d'apex non induits fut chromatographié, et l'éluat de la région du chromatogramme correspondant à la substance E dissous dans 1,1 cc d'eau distillée.

(*) Erreur standard de la moyenne.

4. Action sur le test germination des graines de laitue

Les résultats obtenus avec le test laitue (Tableau IV) confir-

TABLEAU IV

Effet de l'acide gibbérellique et de la Substance E de Rudbeckia speciosa *sur la germination à l'obscurité des graines de laitue « Grand Rapids ».*

Traitements	Pourcentage (1) de graines germées		
	1re expérience	2e expérience	Moyenne
H_2O.....	19 %	17 %	18,0 %
Acide gibbérellique :			
0,1 mg/l.	38	43	40,5
1 mg/l.	55	61	58,0
10 mg/l.	75	85	80,0
100 mg/l.	97	98	97,5
Substance E :			
(2).....	26	29	27,5
(3).....	32	46	39,0
(4).....	51	62	56,5
H_2O (à la lumière) .	95	96	95,5

(1) 100 graines par lot. Comptages après 5 jours de germination à l'obscurité et à 25°C.

Substance E provenant de 125 mg (2), 250 mg (3) et 500 mg (4) d'apex (poids sec) prélevés après 3 semaines de jours longs, dissoute dans 10 cc d'eau distillée.

ment les propriétés de gibbérelline de la substance E. L'effet de stimulation produit par l'extrait de 500 mg de poids sec d'apex correspond à celui de 80 γ/l. d'AG. Remarquons que cette valeur est analogue à celle obtenue avec le test maïs nain. Lorsque l'extrait est préparé à partir d'apex non induits, par contre, il ne stimule pas la germination (Tableau V).

TABLEAU V

Effet de l'extrait d'apex de Rudbeckia speciosa *et de chrysanthème « Shuokan »* non induits *sur la germination à l'obscurité des graines de laitue « Grand Rapids ».*

Traitements	Pourcentage (1) de graines	
	germées :	non germées :
H_2O	13 %	87 %
Rudbeckia (2)	7	93
Shuokan (3).....	9	91
H_2O (à la lumière)	95	5

(1) 100 graines par lot. Comptages après 5 jours de germination à l'obscurité et à 25°C.

(2) L'extrait provenant de 500 mg (poids sec) d'apex de rudbeckia non induits fut chromatographié, et l'éluat de la région du chromatogramme correspondant à la substance E fut dissous dans 10 cc d'eau distillée.

(3) Même remarque que (2) avec des chrysanthèmes « Shuokan ».

5. Action sur la floraison.

L'apparition brusque de la substance E dans l'apex végétatif 3 semaines après le début de l'induction photopériodique, et sa présence continue par la suite dans l'apex reproducteur semblent être en parfaite corrélation avec le déclanchement de la « montée » et avec le développement de la hampe florale. Il était donc important de déterminer quels effets pourrait avoir un traitement à la substance E sur des rudbeckias non induits à fleurir.

Des *Rudbeckia speciosa* âgés de 4 mois et ayant toujours été maintenus en jours courts de dix heures furent traités avec la substance E provenant de 250 apex induits (soit 3,2 g de poids sec), de la manière suivante : trois fois par semaine, pendant quatre semaines, plusieurs pétioles de feuilles reçurent une injection d'extrait (au total 0,1 cc à chaque fois, soit l'équivalent de douze fois l'extrait de 32 mg de poids sec de bourgeon terminal). Huit plantes furent traitées avec cet extrait et huit autres avec de l'eau contenant 0,1 % de « Tween 80 ». A partir du premier jour de traitement, les deux séries de plantes furent placées en régime

de jours courts de 12 heures. Dans ces conditions, *Rudbeckia speciosa* ne fleurit pas normalement.

Un mois après le début du traitement, les premiers signes de montée apparurent sur certaines plantes du lot traité avec la substance E. Le nombre de plantes montant à fleur augmenta progressivement : il atteignait 7 plantes sur 8, deux mois et demi après le début du traitement. A la fin de l'expérience (4 mois après le début du traitement), 6 sur 7 des plantes montées étaient en fleurs.

La plante fleurie et la plante témoin sont représentées Pl. III (1). Tous les témoins, traités au « Tween 80 », étaient restés à l'état de rosettes (Harada et Nitsch, 1959 a).

Le résultat qui vient d'être présenté montre qu'un extrait d'une plante induite, après purification par chromatographie, est capable de provoquer la floraison de plantes de même espèce, maintenues dans des photopériodes qui empêchent normalement toute mise à fleur. Des résultats semblables avaient été obtenus précédemment avec des rudbeckias recevant des jours courts de dix heures, après une application d'extrait brut de bourgeons de rudbeckias induits sous forme de pâte à la lanoline (Harada, 1958). Mais, à cette époque, il n'avait pas été possible de savoir laquelle des substances présentes dans cet extrait était responsable de l'effet observé.

Une seconde expérience enfin a été faite pour vérifier qu'il n'existait dans les plantes en photopériode défavorable aucune substance capable de provoquer la floraison dans la région du chromatogramme correspondant à la substance E.

Suivant la technique précédente, sauf que les plantes furent maintenues toujours en jours courts de 10 heures, des plantes non induites ont été traitées avec l'éluat de la région du chromatogramme correspondant à la substance E (équivalent d'extrait de 50 apex, soit 650 mg poids sec par plante) de *Rudbeckia speciosa* non induits. Aucune des 5 plantes ainsi traitées n'est montée, alors que 4 sur 5 plantes traitées avec de la substance E (équivalent d'extrait de 50 apex par plante) de rudbeckias induits sont montées, et que 3 sur 4 des plantes montées ont fleuri, 4 mois après le début du traitement (Pl. III, (2). Il n'existe donc, dans les rudbeckias non induits, aucune substance capable de les faire fleurir, au moins dans cette région du chromatogramme (cf. Tableaux III et V).

Remarquons enfin que, dans ses effets sur la floraison, la substance E a, encore, une activité de gibbérelline puisque l'acide gibbérellique est capable de provoquer la floraison de rudbeckia non induits (Harada, 1958).

6. Conclusions.

En conclusion, nous pouvons dire que la substance E, qui apparaît dans les apex de rudbeckias induits, possède les propriétés biologiques suivantes :

a) elle est active sur le test mésocotyle comme les auxines et les gibbérellines,

b) elle stimule l'allongement des premières feuilles d'avoine comme l'acide gibbérellique,

c) elle est active sur le test maïs-nain (mutant « Dwarf-1 ») comme les gibbérellines,

d) elle stimule la germination des graines de laitue à l'obscurité comme l'acide gibbérellique,

e) elle produit la floraison de *Rudbeckia speciosa* non induit en jours courts, comme l'acide gibbérellique.

La somme de ces résultats indique que la substance E du rudbeckia appartient au groupe des gibbérellines.

CHAPITRE XV

LA SUBSTANCE E DU CHRYSANTHEME « SHUOKAN »

1. Extraction et purification

Plusieurs séries d'extractions ont été réalisées en vue d'effectuer les tests biologiques mentionnés ci-dessous.

Dans chaque cas, le matériel végétal a été congelé à —25°C dès la récolte, puis lyophilisé et extrait au méthanol à 0°. Les extraits ont été chromatographiés sur du papier Whatman 3 MM (chromatographie ascendante) avec de l'isopropanol à 80%. La zone correspondant à la substance E (Rf 0,6-0,75) a été éluée au méthanol, le méthanol évaporé et le résidu employé pour les traitements. Dans le cas du test pour la germination des graines de laitue, la zone correspondant à la substance E a été découpée en petits morceaux lesquels ont été placés entre deux rondelles de papier-filtre sans élution préalable.

2. Action sur le test maïs-nain

Comme dans le cas des rudbeckias, les préparations de substance E obtenues à partir de chrysantèmes « Shuokan » vernalisés ont provoqué l'allongement des gaines des premières et secondes feuilles de maïs « Dwarf-1 » (Tableau VI), l'extrait provenant de 500 mg (poids sec) d'apex ayant un effet comparable à celui de 77 γ/l. d'acide gibbérellique. Par contre, l'extrait de 500 mg d'apex

de chrysanthèmes *non vernalisés*, purifié et appliqué dans des conditions analogues, s'est révélé complètement inactif sur le même test (Tableau III).

TABLEAU VI

Effet de l'acide gibbérellique et de la substance E de chrysanthème « Shuokan » sur l'allongement des gaines de plantule de maïs « Dwarf-1 ».

Traitements (1)	(Longueurs (en cm) (2)		
	1re gaine (I)	2e gaine (II)	Total (I)+(II)
H_2O.....	2,14	3,05	5,19±0,11 *
Acide gibbérellique :			
10 γ/l.	2,54	3,77	6,31±0,14
100 γ/l.	2,82	5,17	7,99±0,22
Substance E (3).....	3,07	4,85	7,92±0,29
Maïs normal	5,52	9,93	15,45±0,62

(1) 0,1 cc de solution aqueuse par plantule. Toutes les solutions, y compris l'H_2O de la série témoin, contenaient 0,1 % de « Tween 80 ».

(2) Chaque chiffre est la moyenne de 10 plantes mesurées 10 jours après le traitement.

(3) Substance E provenant de 500 mg d'apex (poids sec) prélevée après 3 semaines de vernalisation.

(*) Erreur-standard de la moyenne.

TABLEAU VII

Effet de l'acide gibbérellique et de la substance E de chrysanthème « Shuokan » sur la germination à l'obscurité des graines de laitue « Grand Rapids ».

Traitements	Pourcentage (1) de graines germées :		
	1re expérience	2e expérience	Moyenne
H_2O.....	20 %	18 %	19,0 %
Acide gibbérellique :			
0,1 mg/l.	50	41	45,5
1 mg/l.	66	58	62,0
10 mg/l.	94	79	86,5
100 mg/l.	—	98	98,0
Substance E :			
(2).....	—	21	21,0
(3).....	—	31	31,0
(4)	50	44	47,0
H_2O (à la lumière) .	—	97	97,0

(1) 100 graines par lot. Comptages après 3 jours de germination à l'obscurité et à 25°C.

Substance E provenant de 100 mg (2), 200 mg (3) et 300 mg (4) d'apex (poids sec) prélevés après 3 semaines de vernalisation, dissoute dans 10 cc d'eau distillée.

3. Action sur la germination des graines de laitue

La substance E extraite de chrysanthèmes « Shuokan » induits a augmenté le taux de germination des graines de laitue « Grand Rapids » à l'obscurité complète (Tableau VII). Une préparation analogue, mais à partir de chrysanthèmes non induits, n'eut aucun effet stimulateur sur le même test (Tableau V).

4. Action sur la floraison

Nous avons extrait et purifié par chromatographie assez de substance E (provenant 300 apex, soit 10,8 g (poids sec) d'apex de chrysanthèmes « Shuokan » vernalisés) pour pouvoir traiter d'autres pieds non vernalisés. Tous les pieds traités sont montés, alors que les témoins sont restés en rosette. Sept sur les 8 plantes montées, ont fleuri (Tableau VIII et Pl. IV). Comme cette

TABLEAU VIII

Effet de l'acide gibbérellique et de la substance E de chrysanthème « Shuokan » sur la montée et la floraison de chrysanthèmes « Shuokan » non vernalisés.

Traitements	Longueurs moyennes des tiges (cm) (1)	Nombre moyen des nœuds (1)	Longueur moyenne des entre-nœuds (en cm) (1)	Pourcentage des plantes fleurissantes
H_2O (2)	15,4±2,3*	44,9±1,2*	0,34	0 %
Acide gibbérellique (3)..	76,1±2,0	49,3±1,4	1,55	100
Substance E (4) ..	69,3±3,7	55,1±1,3	1,26	88

(1) Chaque chiffre est la moyenne de 8 mesures. Résultats mesurés 22 semaines après le début des traitements.

(2) Appliquée par moitié sous forme de pâte à la lanoline, par moitié en injections dans les pétioles avec 0,1 % de « Tween 80 » (cf. E).

(3) Par plante : 20 mg de pâte à la lanoline contenant 50 γ d'AG, appliquée en une fois.

(4) Par plante : substance E provenant de 1,35 g (poids sec) d'apex vernalisés appliquée par moitié sous forme de pâte à la lanoline, par moitié sous forme d'injections dans les pétioles (avec 0,1 % de « Tween 80 »).

(*) Erreur-standard de la moyenne.

variété de chrysanthèmes peut être mise à fleur sans vernalisation par l'acide gibbérellique (Harada et Nitsch, 1959 b), une autre série avait été traitée parallèlement avec de la gibbérelline AG : toutes ces plantes sont montées et ont fleuri, elles aussi (Harada, 1960).

Dans une seconde expérience, 3 lots de 5 plantes déverna-

lisées, d'aspect homogène, ont été traités, le premier avec des solutions de « Tween 80 » à 0,1 %, le second avec la substance E purifiée par chromatographie provenant de 300 apex (10,5 g poids sec) de plantes vernalisées (extrait de 60 apex par plante traitée), le troisième éluat de la région du chromatogramme correspondant à la substance E provenant de 300 apex (10,5 poids sec) de plantes non vernalisées (extrait de 60 apex par plante). Les 3 lots ont été placés dans une serre à une température minimum de 15°C.

Aucune plante des premier et troisième lots n'est montée ni n'a fleuri jusqu'à la fin de l'expérience. Par contre, toutes les plantes du second lot sont montées et ont fleuri 22 semaines après le début des traitements. Les apex non vernalisés contiennent donc trop peu de substance E pour causer la floraison de chrysanthèmes « Shuokan » non vernalisés.

5. Conclusions

Les résultats observés avec les préparations de substance E obtenue à partir d'apex de chrysanthèmes « Shuokan » vernalisés sont semblables à ceux observés avec la substance E de rudbeckias induits. Dans les deux cas, les préparations sont actives, comme les gibbérellines, sur le test maïs-nain et sur la germination des graines de laitue. Comme dans le cas du rudbeckia aussi, la substance E extraite de chrysanthèmes « Shuokan » vernalisés induit la floraison de plantes non induites de même nature. Ici encore, nous savons que l'acide gibbérellique peut causer la floraison dans les mêmes conditions.

Tous ces faits indiquent, comme dans le cas du rudbeckia, que la substance E du chrysanthème « Shuokan » appartient, par ses propriétés physiologiques, au groupe des gibbérellines.

CHAPITRE XVI

LA SUBSTANCE E DE LA ROSE-TRÉMIÈRE : ISOLEMENT ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Les résultats des tests biologiques obtenus avec les préparations de substance E de rudbeckia et de chrysanthèmes « Shuokan » induits indiquent tous que ces substances E appartiendraient au groupe des gibbérellines. Cependant, la seule démonstration vraiment irréfutable d'une telle présomption reste l'isolement chimique de ces substances. Or nous avons vu plus haut combien faibles sont les quantités (mesurées en gammas d'AG) présentes dans les apex. Bien plus, nous n'avons généralement pas pu mettre en évidence de substance E dans des organes plus volumineux tels que feuilles adultes, tiges ou racines.

Pour réunir le plus de chances d'arriver à isoler une substance E, nous avons recherché un matériel végétal ayant des caractères suivants : (1) être riche en substance E ; (2) être facile à cultiver en grandes quantités ; (3) pouvoir être soumis facilement aux traitements photopériodiques ou vernalisants nécessaires à la production de cette substance.

Après avoir essayé de nombreuses espèces, nous avons choisi la rose-trémière bisannuelle (*Althaea rosea* Cav.), variété « Fordhook Giant Double Scarlet ». Le bourgeon terminal de rose-trémière est relativement gros, et, après le traitement par le froid, l'activité ou la quantité de la substance qui nous intéresse augmente dans le bourgeon. Les plantes peuvent être cultivées facilement au champ et vernalisées sur place par la température hivernale.

1. Extraction du matériel végétal

Les graines furent semées en « Jiffy-pots » en mai 1959 ; les plantules furent ensuite transplantées au champ. Trois cent soixante pieds furent ainsi cultivés, chaque pied portant de 5 à 8 bourgeons au printemps.

Le 13 avril 1960 ont été récoltés 2400 bourgeons terminaux vigoureux, d'une part, et les très jeunes feuilles dont le limbe avait moins de 5 cm de long, d'autre part. Un kilo et demi de bourgeons et 7,6 kg de feuilles furent ainsi récoltés et immergés sur place dans du méthanol froid. Le tout fut transporté à la glacière à —25°C. Les bourgeons et les feuilles furent broyés dans du méthanol froid, puis extraits 5 fois successivement avec du méthanol redistillé. 50 litres de méthanol pour les bourgeons et 80 litres pour les feuilles furent employés. Les extraits méthanoliques des bourgeons et des feuilles ont été concentrés séparément jusqu'à 1 litre chacun, au moyen de cyclone évaporateur, puis lyophilisés.

2. Purification des extraits

a) *Essais préliminaires* :

De nombreuses méthodes de purification ont été essayées avant d'aboutir. Il n'est pas utile de décrire tous nos essais qui ont été plus ou moins infructueux. Signalons simplement que les tentatives de fractionnement entre deux solvants non miscibles comme l'eau et l'éther (cf. Larsen 1955) ne conduisirent qu'à une dispersion de la substance E dans les deux phases. Sur une colonne de charbon actif mélangé à de la terre d'infusoire, la substance active fut si fortement fixée qu'elle ne put être éluée par la suite. Des chromatographies sur une colonne de gel de silice ne séparèrent

pas la substance E des impuretés. Enfin des essais de chromatographie sur de la cellulose (poudre ou rouleaux de papier) ne produisirent pas de meilleurs résultats.

Devant ces échecs successifs, nous nous sommes attachés à la recherche des solvants qui, en dissolvant le maximum de substance E, dissoudraient en même temps le minimum d'impuretés. C'est ainsi que nous avons pu mettre au point la méthode qui suit.

b) *Méthode utilisée* :

Les jeunes feuilles et les bourgeons ont été traités séparément, mais par la même succession d'étapes. Seules différaient les quantités de solvants utilisées (2 fois plus importantes pour les jeunes feuilles que pour les bourgeons).

Après lyophilisation, l'extrait méthanolique sec (45 g pour les bourgeons, et 278 g pour les feuilles) a été broyé en poudre très fine, puis dissous dans 1 litre d'eau à 1°C et congelé à —25°C. En dégelant doucement cette solution à 3°C, les chlorophylles et leurs produits de dégradation se rassemblèrent en amas qui purent être facilement séparés du liquide par filtration. La fraction insoluble fut lavée 4 fois encore à l'eau distillée puis jetée. Les filtrats successifs furent réunis, congelés, lyophilisés et broyés après dessiccation complète.

La poudre ainsi obtenue, débarrassée des chlorophylles, fut extraite cinq fois avec du méthanol redistillé (1 litre à chaque fois). Les produits insolubles dans le méthanol furent soigneusement éliminés par filtration et centrifugation. L'extrait méthanolique fut évaporé à sec, laissant une poudre jaune. Cette poudre jaune fut extraite ensuite avec de l'acétate d'éthyle (5 fois un litre). Presque toute la substance E et la majeure partie des substances B et C furent dissoutes par l'acétate d'éthyle.

L'acétate d'éthyle fut évaporé à sec, laissant une poudre jaune pâle. Cette poudre jaune pâle fut extraite avec 5 fois 100 cc d'acétone. La presque totalité de la substance E et à peu près la moitié des substances B et C ont été ainsi dissoutes par l'acétone. Le résidu insoluble fut éliminé.

Ainsi, beaucoup d'impuretés purent être éliminées par des extractions successives à l'eau, au méthanol, à l'acétate d'éthyle et à l'acétone, sans perdre toutefois trop des substances recherchées.

La solution acétonique contenant 3 substances actives fut concentrée jusqu'à 5 cc environ, et appliquée sur la ligne du départ d'une grande feuille de papier à chromatographie Whatman n° 17 (46×57 cm). Après équilibration pendant 8 heures dans les vapeurs du solvant, le chromatogramme fut développé (en chromatographie ascendante) dans de l'isopropanol à 80%. Lorsque le front du solvant eut atteint la distance de 30 cm au-dessus de la ligne

de départ, le papier fut séché et une bande-témoin découpée. Le test mésocotyle ayant révélé la position de la substance E, cette région (entre les Rf 0,55 et 0,75) fut découpée et éluée avec du méthanol redistillé. A ce stade, la substance E provenant des feuilles et celle provenant des bourgeons furent rassemblées. Après évaporation du méthanol, la substance E fut dissoute dans 5 cc de *n*-butanol chaud. Cette solution fut refroidie très doucement jusqu'à —10°C. Au bout de 3 jours, la substance E cristallisa au fond du flacon. La cristallisation fut répétée 3 fois en changeant le *n*-butanol chaque fois. Nous avons ainsi pu obtenir des cristaux purs. Les cristaux se formèrent en petites masses et se présentèrent sous forme de losanges. Les cristaux furent lavés avec de l'hexane et placés dans un dessiccateur contenant de la paraffine pour absorber les vapeurs d'hexane et de la glycérine pour enlever les traces d'eau. Nous avons finalement obtenu en tout 5,5 mg environ de cristaux de substance E.

Le schéma qui suit résume la succession des opérations réalisées au cours de la purification de la substance E.

3. Propriétés physico-chimiques de la substance E cristallisée (1)

Point de fusion. — A 290° les cristaux sont encore intacts ; à 300°C, on observe une décomposition du produit.

Spectres infra-rouge et ultra-violet. — Le spectre infra-rouge obtenu (fig. 21) complété par le spectre ultra-violet (de 2000 à 2600 Å) est différent de celui des gibbérellines connues. En particulier, il indiquerait l'absence de noyaux aromatiques.

Courbe titrimétrique. — La courbe titrimétrique du produit cristallisé ne met en lumière aucune fonction acide libre.

Teneur en azote. — Un microdosage d'azote a montré que le corps cristallisé ne contenait pas d'azote ou, du moins, pas plus de 5 %.

Réactions colorées. — Les réactifs servant à déceler les substances indoliques sur les chromatogrammes, tels que le réactif d'Ehrlich à la *p*-diméthyl-amino-benzaldéhyde et celui de Gordon et Weber au perchlorure de fer n'ont donné aucun résultat. Il en a été de même pour l'acide sulfurique (5% dans le méthanol) qui, après chauffage à 55° pendant 15 minutes, produit, avec l'acide gibbérellique, une fluorescence jaune vert dans l'ultra-violet. Enfin, le permanganate de potassium en solution aqueuse,

(1) Nous remercions très vivement MM. Laboureur et Roux de la Société d'Etudes et d'Applications Biochimiques de Jouy-en-Josas (S.-et-O.), grâce à qui les propriétés physico-chimiques de la substance E ont été déterminées.

EXTRACTION DE LA SUBSTANCE E A PARTIR DE LA ROSE-TRÉMIÈRE.

	2400 bourgeons (poids frais : 1,5 kg)	Jeunes feuilles (poids frais : 7,6 kg)
1) Extraction au méthanol froid (—10° à —25°C). Extrait méthanolique brut :	50 litres	80 litres
2) Concentration au cyclone-évaporateur (<30° C) jusqu'à	1 litre	1 litre
3) Lyophilisation de l'extrait concentré. Poudre noire :	45 g.	278 g.
4) Extraction à l'eau froide (<3°C) et filtration. Rejet des chlorophylles. Reste phase aqueuse	2 litres	4 litres
5) Lyophilisation. Poudre jaune foncé	22 g.	98 g.
6) Extraction au méthanol absolu à 3°C. Rejet de la partie insoluble. Extrait méthanolique	5 litres	10 litres
7) Evaporation du méthanol. Poudre jaune	7 g	19 g
8) Extraction à l'acétate d'éthyle. Rejet de la partie insoluble, contenant un peu de substance B et C. Phase liquide.	5 litres	10 litres
9) Evaporation de l'acétate d'éthyle. Poudre jaune pâle	0,9 g	1,1 g
10) Extraction à l'acétone. Rejet de la partie insoluble, contenant la moitié des substances B et C. Extrait acétonique	0,5 litre	0,5 litre
11) Réunion des extraits acétoniques. Concentration. Séparation des substances B, C et E par chromatographie sur papier		
12) Elution de la zone correspondant à la substance E. Cristallisation de la substance E dans le *n*-butanol	5,5 mg	

à 0,5%, qui produit une coloration jaune à l'endroit de la substance E sur les chromatogrammes d'extrait brut de chrysanthème « Shuokan » n'a produit aucune coloration visible avec 5 gammas de substance E de rose-trémière cristallisée.

En résumé, les propriétés physico-chimiques qui ont pu être

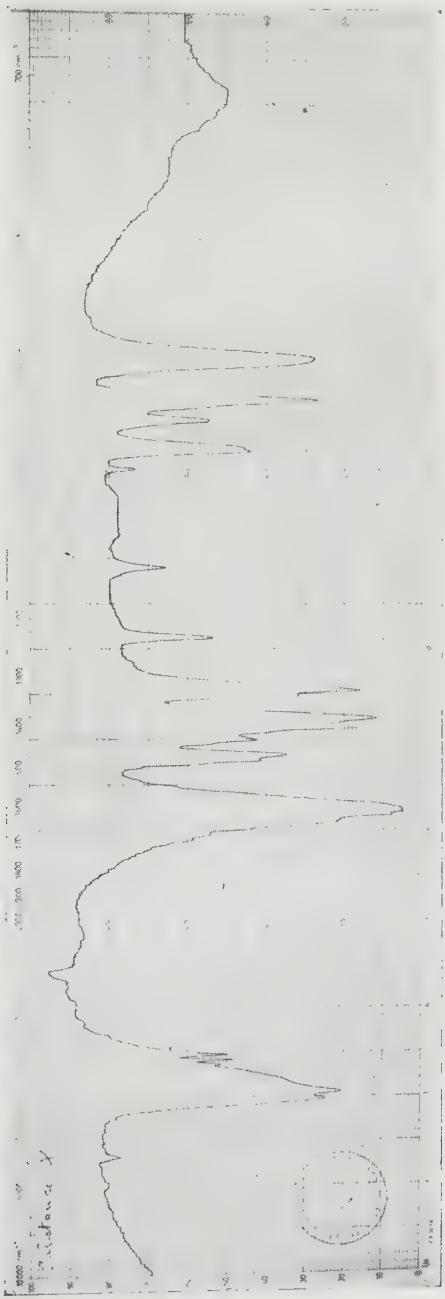


Fig. 21. — Spectre infra-rouge de la substance E de rose-trémière cristallisée (incorporée dans du KBr).
En abscisses : longueur d'onde en microns (graduation du bas) ; *en ordonnées* : pourcentage de transmission. (D'après Harada et Nitsch, 1961).

déterminées indiquent que la substance E cristallisée n'appartient ni au groupe des auxines indoliques ni à celui des gibbérellines.

CHAPITRE XVII

LA SUBSTANCE E DE LA ROSE-TRÉMIÈRE : PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Avec le peu de matériel cristallisé dont nous disposions après les prélèvements nécessités par les études physico-chimiques, nous avons réussi néanmoins à faire de nombreux tests biologiques qui nous ont permis d'obtenir un tableau relativement complet de ses propriétés.

1. Action sur le test mésocotyle

La substance E de rose-trémière est évidemment active sur le test mésocotyle puisque c'est lui qui nous a permis de la détecter et de l'isoler. Avec le produit cristallisé nous avons pu

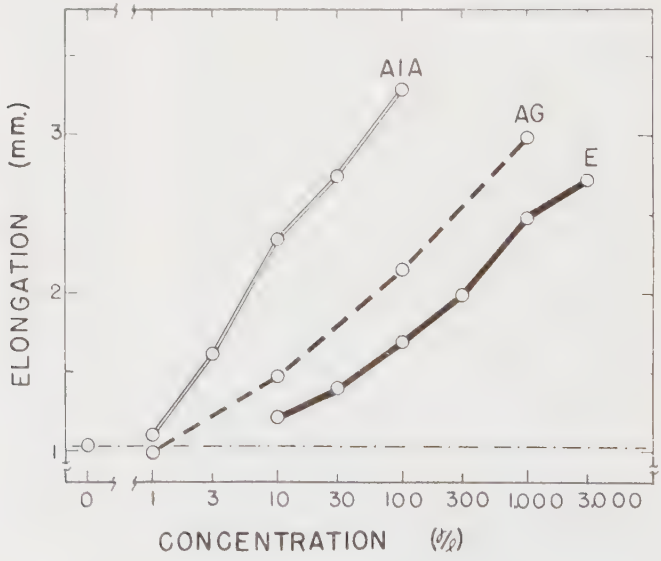


Fig. 22. — Effet de l'acide 3-indolyl-acétique, de l'acide gibbérellique et de la substance E de rose-trémière sur l'élongation de mésocotyles d'avoine (test mésocotyle).

En abscisses : concentrations (exprimées en γ/l.) des 3 substances utilisées. *En ordonnées* : élongation, au-delà de la longueur initiale, des segments de mésocotyles d'avoine (chaque point est la moyenne de 10 segments mesurant 4 mm au départ).

La ligne (traits et points) représente le niveau du témoin. (D'après Harada et Nitsch, 1961).

établir une gamme de concentrations connues, que nous avons comparée à une série de dilutions d'acide 3-indolylacétique, d'une part, d'acide gibbérellique, d'autre part. Les résultats (fig. 22) montrent que, à poids égal, l'acide gibbérellique a une activité environ 5 fois plus forte que la substance E. On remarque que les pentes des courbes de l'AG et de la substance E sont analogues. Par contre, la pente de la courbe correspondant à l'AIA est nettement différente.

Le test mésocotyle donnant des résultats positifs avec les auxines comme avec les gibbérellines, ne permet pas de décider si la substance E appartient à l'une ou l'autre de ces catégories de substances de croissance.

2. Action sur le test *Avena*.

Pour savoir si la substance E appartient au groupe des auxines, le test le plus spécifique à essayer est le test courbure de Went. A part quelques courbures irrégulières ou douteuses, ce test n'a donné que des résultats négatifs (1). On peut donc dire que, jusqu'à la forte concentration de 5 mg par litre, la substance E de rose-trémière n'a pratiquement pas d'effet sur le test *Avena*.

Si ce résultat veut dire que la substance E n'est certainement pas de l'AIA, il ne peut, à lui seul, éliminer cette substance de la catégorie des auxines, car certaines auxines n'agissent pas sur le test courbure.

3. action sur le test topinambour

Nous avons donc eu recours à un autre test qui réagit à une gamme très étendue d'auxines, tout en étant absolument insensible aux gibbérellines : le test topinambour.

Des petits explantats de tubercule de topinambour ont été placés sur les milieux suivants :

(A) milieu de base.
(B) milieu de base, + 0,1 mg/l. d'acide 3-indolyl-acétique.
(C) milieu de base, + 0,1 mg/l. d'acide 3-indolyl-acétique, + 0,1 mg/l. de substance E.
(D) milieu de base, + 0,01 mg/l. de substance E.
(E) milieu de base, + 0,1 mg/l. de substance E.
(F) milieu de base, + 1 mg/l. de substance E.

A la fin des expériences, c'est-à-dire 5 semaines après le placement des morceaux sur les milieux, les résultats sont nets. Comme on peut le voir sur la photo (Pl. V (1) et fig. 23, aucune

(1) Déterminations faites dans le laboratoire du Prof. Larsen à l'Université de Bergen (Norvège) et au Phytotron à Gif. Nous remercions bien vivement M. le Prof. Larsen, M. le Prof. J.H.M. Henderson et M. le Dr Aasheim pour leur aide si bienveillante.

croissance ne s'est produite sur le premier milieu, par contre, tous les autres ont provoqué plus ou moins la prolifération. L'acide 3-indolyl-acétique et la combinaison AIA+E ont stimulé vigoureusement la croissance, ce qui montre que la substance E n'inhibe pas l'effet de l'AIA. Bien plus, en l'absence d'AIA, la substance E, pratiquement inactive aux faibles concentrations (10 γ/l.), stimule la prolifération des tissus de topinambour aux concentrations

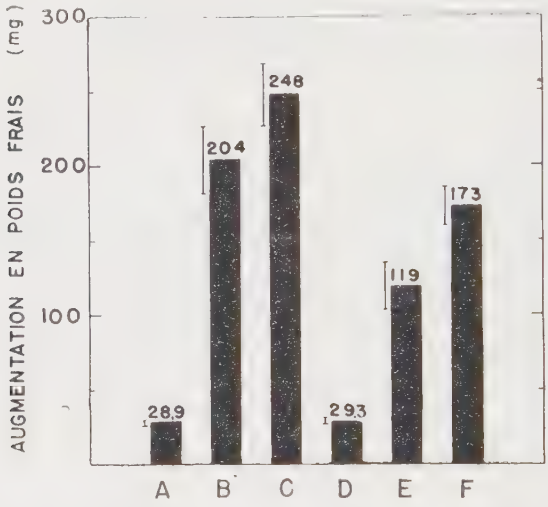


Fig. 23. — Effet de l'acide 3-indolyl-acétique et de la substance E de rose-trémière sur l'augmentation de poids frais des cultures de parenchyme vasculaire de topinambour (clône P 17). Poids frais des explantats au départ : 20 mg±1 mg.

Chaque résultat est la moyenne de 12 cultures pesées 5 semaines après l'ensemencement.

Les chiffres surmontant les barres noires donnent les valeurs exactes. Les barres verticales représentent la valeur de l'erreur standard de la moyenne. A = série témoin ; B = AIA 0,1 mg/l. ; C = AIA 0,1 mg/l. + substance E 0,1 mg/l. ; D = Substance E 0,01 mg/l. ; E = Substance E 0,1 mg/l. ; F = Substance E 1 mg/l. (D'après Harada et Nitsch, 1961).

de 100 et 1000 γ/l. Bien que cette stimulation soit environ 30 fois plus faible que celle produite par une concentration égale d'AIA, ce résultat indique que la substance E peut stimuler la division cellulaire chez le topinambour comme une auxine.

4. Action sur l'enracinement

Les hypocotyles de *Phaseolus aureus*, préparés comme il a été indiqué au Chapitre XIII, réagissent à l'AIA par une pro-

duction accrue de racines à mesure que la concentration d'auxine progresse de 3 à 30 γ/l., production qui atteint alors un palier et reste fixe au-delà de cette concentration (Hess, 1957, 1961). Ainsi que le montrent les résultats du Tableau IX, la substance E,

TABLEAU IX

Effet de l'acide 3-indolyl-acétique, de l'acide gibbérellique et de la substance E de rose-trémière sur l'enracinement des hypocotyles de plantules de Phaseolus aureus.

Traitements	Nombre moyen de racines (1)		
	1re expérience	2e expérience	Moyenne
H_2O.....	5,7	5,9	5,8
Acide 3-indolyl-acétique :			
3 γ/l.	6,5	7,0	6,8
10 γ/l.	7,3	7,1	7,2
30 γ/l.	8,0	7,8	7,9
Acide gibbérellique :			
10 γ/l.	5,4	5,3	5,4
100 γ/l.	5,2	4,5	4,9
Substance E :			
10 γ/l.	5,1	5,4	5,3
100 γ/l.	5,5	5,5	5,5
1000 γ/l.	5,3	5,5	5,4

(1) Chaque chiffre est la moyenne des racines apparues sur 10 hypocotyles, après 5 jours de traitement.

pas plus que l'acide gibbérellique, n'augmente le nombre des racines au-dessus de celui des témoins traités à l'eau. Dans ce test, la substance E agit donc comme une gibbérelline plutôt que comme une auxine.

5. Action sur le test « maïs nain »

La substance E cristallisée a été essayée à trois concentrations différentes sur chacun des trois mutants nains de maïs, le « Dwarf-1 », le « Dwarf-3 » et le « Dwarf-5 ». Les résultats obtenus ont été consignés dans le Tableau X. Ce tableau montre de façon indubitable que la substance E est active sur les trois mutants de maïs. A poids égal, la substance E est environ 10 fois moins active que l'AG sur le « Dwarf-1 » et le « Dwarf-3 », mais elle est aussi active que l'AG sur le « Dwarf-5 ».

Le test maïs-nain étant réputé (Phinney, 1956) être absolument spécifique des gibérellines, les résultats positifs obtenus

avec les trois mutants prouveraient que la substance E est une gibbérelline.

TABLEAU X

Effet de l'acide gibbérellique et de la substance E de rose-trémière sur l'allongement des gaines de plantules de maïs « Dwarf-1 », « Dwarf-3 » et « Dwarf-5 ».

Traitements (1)	Somme des longueurs : 1re gaine + 2e gaine (en cm) (2)		
	« Dwarf-1 »	« Dwarf-3 »	« Dwarf-5 »
H_2O	5,44±0,15 *	5,71±0,29 *	3,34±0,06 *
Acide gibbérellique:			
1 γ/l.	5,68±0,27	6,02±0,32	3,68±0,23
10 γ/l.	6,54±0,18	6,98±0,37	3,83±0,34
100 γ/l.	8,30±0,47	7,09±0,38	
Substance E :			
1 γ/l.	5,54±0,25	5,84±0,26	3,71±0,16
10 γ/l.	5,88±0,17	6,00±0,43	3,87±0,12
100 γ/l.	6,09±0,27	6,79±0,26	3,90±0,12
Maïs normal	17,73±0,34	20,06±0,48	15,14±0,15

(1) 0,1 cc par plantule de solution aqueuse contenant 0,1 % de « Tween 80 ».

(2) Chaque chiffre est la moyenne de 10 plantes mesurées une semaine après le traitement.

(*) Erreur-standard de la moyenne.

6. Action sur la germination des graines de laitue

Si la substance E est une gibbérelline, on peut s'attendre à ce qu'elle stimule la germination des graines de laitue à l'obscurité totale, comme le fait l'acide gibbérellique. Or, comme le montrent les résultats du Tableau XI, il n'en est rien. Ce fait est d'autant plus surprenant que, comme nous l'avons vu au cours des Chapitres XIV et XV, les substances E du rudbeckia et du chrysanthème « Shuokan » sont, toutes deux, actives sur le test « graines de laitue ».

7. Action sur la montaison

L'augmentation nette et rapide de la substance E dans les apex et les jeunes feuilles après la vernalisation semble être en parfaite corrélation avec la « montée à fleur » et le développement de la tige qui se transforme en hampe florale. Il était donc important d'essayer la substance E cristallisée sur des plantes en rosette, en particulier sur des roses-trémières bisannuelles non vernalisées.

TABLEAU XI

Effet de l'acide gibbérellique et de la substance E de rose-trémière sur la germination, à l'obscurité, des graines de laitue « Grand Rapids ».

Traitements (1)	Pourcentage (2) de graines	
	germées :	non germées :
H_2O	7 %	93 %
Acide gibbérellique :		
0,1 mg/l.....	35	65
1 mg/l.....	52	48
10 mg/l.	81	19
50 mg/l.....	95	5
Substance E :		
1 mg/l.....	7	93
10 mg/l.....	9	91
50 mg/l.....	8	92
H_2O (à la lumière)	96	4

(1) 5 cc d'eau distillée ou de solution par boîte de Pétri.
(2) 100 graines par lot. Compté après 5 jours de germination à l'obscurité et à 25 °C.

Trois lots, consistant chacun en 10 roses-trémières bisannuelles (var. Fordhook Giant Double Scarlet) non vernalisées, âgées d'environ 4 mois, furent traités avec une des 3 pâtes à la lanoline suivantes : (1) substance E (0,1 mg par gramme de lanoline) ; (2) acide gibbérellique (0,1 mg par gramme de lanoline) ; (3) lanoline pure. Environ 30 mg de l'une de ces pâtes furent déposés sur l'apex de chaque plante et aussi à l'extrémité des pétioles de quelques jeunes feuilles après élimination des limbes. Les plantes furent traitées de cette façon durant 10 semaines, à raison d'une application de pâte par semaine. Deux mois après le début du traitement, certaines plantes traitées avec l'AG ou la substance E commencèrent à « monter ». Quatre semaines plus tard, toutes les plantes traitées par l'AG et par la substance E montaient. Pourtant, six semaines après que les premières plantes soient montées, aucune d'entre elles n'avaient fleuri, mais on pouvait observer la formation de nouvelles rosettes (rosettes perchées) à l'extrémité des tiges qui avaient alors atteint 10 à 40 cm de haut (Pl. V (2), et tableau XII).

Ainsi, la substance E, comme l'acide gibbérellique, a bien provoqué la montaison (mais non la floraison) des roses-trémières non vernalisées.

8. Action sur la floraison

Nous venons de voir que la substance E (comme l'acide gibbérellique) a été incapable de provoquer la floraison de la rose-trémière non vernalisée. Sur *Rudbeckia speciosa* cependant les résultats ont été tout différents.

Trois lots de 10 plantes élevées en jours courts de 10 h. furent traités, 4 mois après le semis, avec les mêmes pâtes à la lanoline et les mêmes quantités que précédemment. Ces pâtes furent déposées sur les apex et à la surface inférieure des jeunes feuilles, après

TABLEAU XII

Effets de la substance E et de l'acide gibbérellique sur la montaison et la floraison de roses-trémières et de rudbeckias en conditions non inductives.

Roses-trémières bisannuelles, var. « Fordhook Giant Double Scarlet », non vernalisées.
Rudbeckia speciosa en jours courts de 10 h.

Plante	Traitements	Nombre de plantes	Pourcentage de plantes montées	Hauteur moyenne de la tige (cm)	Pourcentage de plantes fleuries
Roses-trémières	H_2O	10	0 %	2,3±0,4*	0 %
	Substance E	10	100 %	11,9±1,2	0 %
	AG	10	100 %	19,7±3,7	0 %
Rudbeckia speciosa	H_2O	10	10 %	—	10 %
	Substance E	10	100 %	—	100 %
	AG	10	100 %	—	100 %

(*) Erreur-standard de la moyenne.

avoir lésé l'épiderme de celles-ci de façon à faciliter l'absorption des principes actifs inclus dans la pâte. Un mois et demi après le début du traitement, 8 plantes sur les 10 traitées avec la substance E et 8 plantes sur les 10 traitées à l'AG commencèrent à monter. Trois mois après le début du traitement, toutes les plantes traitées par E et AG étaient montées. Bien plus, à cette date, deux des plantes traitées avec la substance E et de celles traitées à l'AG étaient fleuries. Quatre mois après le début du traitement, toutes les plantes traitées par E ou par AG étaient fleuries ainsi qu'une plante traitée par la lanoline pure (Pl. VI (1) et Tableau XII).

Il est donc clair que la substance E de rose-trémière, comme la substance E de rudbeckia (chapitre XIV) et l'acide gibbérellique, est capable de provoquer la floraison chez les rudbeckias non induits.

9. Action sur le test moelle de tabac

La substance E aurait-elle les propriétés d'une « kinine » en plus de ses autres propriétés biologiques ? Pour répondre à cette question, nous avons incorporé cette substance dans les milieux de culture de fragments de moelle de tabac, la substance E étant stérilisée par filtration.

Cinq séries de milieux ont été réalisés :

I. solution de base.
II. solution de base + kinétine 0,1 mg/l.
III. solution de base + substance E 0,01 mg/l.
IV. solution de base + substance E 0,1 mg/l.
V. solution de base + substance E 1 mg/l.

TABLEAU XIII

Effet de la kinétine et de la substance E de rose-trémière sur la prolifération de la moëlle de tabac (variété « Wisconsin 38 »).

Degré de prolifération	Nombre de morceaux de moëlle				
	témoin	kinétine 0,1 mg/l.	Susbtance E		
			0,01 mg/l.	0,1 mg/l.	1 mg/l.
0	11	0	12	12	12
+	1	0	0	0	0
++	0	4	0	0	0
+++	0	8	0	0	0

Le tableau XIII et la photo (Pl. XXIX (2), montrent les résultats obtenus. Il est clair que, 5 semaines après la mise en culture des morceaux de moelle, pratiquement aucune prolifération ne s'est produite sur les milieux I, III, IV et V ; par contre, le milieu II, contenant de la kinétine, a provoqué une certaine prolifération. On peut donc dire que, jusqu'à la concentration de 1 mg/l., la substance E de rose-trémière ne stimule pas la prolifération de la moelle de tabac dans les conditions de ce test. Ce comportement indique que cette substance n'a pas l'activité de la kinétine.

10. Conclusions

Les résultats obtenus avec les divers tests biologiques conduisent à la conclusion suivante : la substance E, cristallisée à partir des extraits d'apex de rose-trémière, a certaines des propriétés

biologiques des auxines (action sur le test topinambour) mais non pas toutes (elle est inactive sur le test *Avena* et sur un test d'enracinement) et aussi certaines des propriétés des gibbérellines (action sur les mutants nains de maïs, sur la montaison de la rosette trémière et sur la floraison du rudbeckia, mais non pas toutes (inactivité sur la germination des graines de laitue). Elle n'a pas la propriété des « kinines » de stimuler la prolifération de la moëlle de tabac en présence d'auxine.

CINQUIÈME PARTIE

DISCUSSION GÉNÉRALE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE DE CERTAINES SUBSTANCES ENDOGÉNES DANS LES PHÉNOMÈNES DE MISE A FLEUR ET DE MONTAISON.

Après avoir exposé les résultats expérimentaux de nos recherches il est utile de refléchir sur ce qu'ils apportent de nouveau en Biologie Végétale. Nous essayerons de grouper ces considérations sous deux rubriques générales concernant le rôle de substances endogènes dans la mise à fleur, d'une part, dans le phénomène de montaison, d'autre part.

CHAPITRE XVIII

SUBSTANCES ENDOGÈNES ET MISE A FLEUR

Les expériences décrites dans la Deuxième Partie de ce travail ont donné des résultats qui éclairent les trois points suivants : la transmissibilité du stimulus floral, le bloquage de l'induction florale par l'état non-vernalisé et le rôle indirect des gibbérellines dans la floraison.

1. Transmissibilité du stimulus floral.

Les expériences présentées au Chapitre IV montrent de façon claire que l'on peut faire fleurir, en conditions photopériodiques non inductives, un rameau de chrysanthème en le greffant sur une plante fleurissante de même espèce. Ce résultat confirme ceux de nombreux auteurs, dont Moshkov (1937), et indique qu'un « stimulus » floral passe effectivement de la plante fleurissante au greffon. Le caractère de transmissibilité est donc bien certain.

La transmission du « florigène », cependant, n'a pu être réalisée par l'intermédiaire d'un parasite tel que le *Cuscuta Gronovii*. Un tel échec indique-t-il que le « florigène » n'a pas la nature d'un virus ? Pas nécessairement. En effet, Bennett (1944) a montré que, si tous les virus du type « jaunisse » sont transmis par le *Cuscuta campestris*, le pourcentage de transmission varie de 8 à 82%

suivant les types de « jaunisses ». D'autre part, certains virus, tels que la mosaïque de la betterave, ne sont pas transmis du tout, alors que la mosaïque du concombre est transmise à 100%. Enfin, la facilité de la transmission peut dépendre de l'espèce de cuscute employée : par exemple *Cuscuta campestris* transmet la frisolée de la betterave (« sugar-beet curly top ») dans 50% des cas, alors que *Cuscuta subinclusa* et *C. californica* ne le font que dans 10%. L'impossibilité que nous avons observée de transmettre la floraison de plantes fleurissantes à plantes végétatives au moyen de *Cuscuta Gronovii* chez *Chrysanthemum morifolium* var. « Honeysweet », *Xanthium pennsylvanicum* et *Perilla crispa* ne peut donc constituer une preuve que le florigène n'est pas une nucléoprotéine du type virus. Mentionnons encore l'observation de Baldev (1960) selon laquelle la floraison du *Cuscuta reflexa* aux Indes est indépendante de la floraison des plantes-hôtes.

2. Bloquage de l'induction florale par l'état non vernalisé

Il est bien connu que le traitement vernalisant doit précéder le traitement photopériodique si l'on veut obtenir des fleurs (voir les mises au point de Lang, 1952 et de Chouard, 1960). Les expériences de greffage entre chrysanthèmes nécessitant une vernalisation (var. Shuokan) et ceux n'en nécessitant pas (var. Honeysweet) ont souligné à nouveau un autre côté du problème en montrant qu'une plante non-vernalisée ne peut pas être mise à fleur par greffage sur une plante fleurissante. Ce bloquage de l'induction florale par l'état non vernalisé pourrait être dû soit à la présence d'un inhibiteur de floraison ou d'un mécanisme de destruction rapide du florigène, soit à l'absence d'une substance X dont le présence serait nécessaire pour permettre au florigène de provoquer la mise à fleur.

Les expériences que nous avons faites ne permettent pas de distinguer entre ces hypothèses.

En tous cas, les résultats obtenus avec les greffes de rosestrémières confirment le fait déjà connu que le traitement de la racine par le froid ne peut pas causer la floraison de bourgeons non vernalisés. Il semble donc bien que les transformations biochimiques produites par le traitement vernalisant aient leur siège dans le bourgeon lui-même, comme le veut la théorie classique.

3. Role indirect de l'acide gibbérellique dans la mise a fleur

Arrêtons-nous un moment sur l'expérience V du Chapitre IV : l'acide gibbérellique ne fait pas fleurir le chrysanthème « Honey-

sweet » en jours longs. Cependant, il est capable de remplacer, chez la variété « Shuokan », le traitement par le froid et de provoquer la floraison. Mais on peut greffer un rameau non induit de la variété « Honeysweet » sur la variété « Shuokan » induite par l'AG ; on observe alors la floraison du rameau greffé. En d'autres termes, la variété « Honeysweet » ne peut être mise à fleur par l'AG directement mais peut l'être indirectement, lorsque l'AG a provoqué la mise à fleur de la variété servant de porte-greffe. Cette expérience met en lumière l'action indirecte de l'AG dans la mise à fleur des plantes de jours courts.

Quel est donc le complexe de substances intermédiaires à travers lesquelles l'AG agit ainsi ? Nous avons vu, au Chapitre X, que la vernalisation du chrysanthème « Shuokan » cause l'apparition, dans les extraits de points végétatifs, d'une nouvelle substance, la substance E. Nous avons vu également, au Chapitre XV, que cette substance E du chrysanthème « Shuokan » est capable, à elle seule, de causer la montaison et la floraison de pieds non vernalisés de la même espèce. On peut donc s'attendre à voir apparaître, sur les chromatogrammes de chrysanthème « Shuokan » mis à fleur par l'AG, l'apparition d'un pic d'activité à l'endroit de la substance E. Or il n'en est rien (fig. 18).

Par contre, la fig. 20 indique une augmentation d'au moins 50 fois de la substance B, trois semaines après le début du traitement à l'AG. Cet effet de l'AG est semblable à celui observé par Nitsch (1958) sur les haricots nains ou à rames. Avec ce matériel, Nitsch a montré que l'activité de la substance B doublait 4 heures après l'administration d'AG pour décupler même, dans certains cas, après 1 jour. Dans le cas du haricot, cependant, l'application d'AG produit aussi des variations dans les niveaux d'autres substances endogènes (voir aussi Nitsch et Nitsch, 1959 b).

De toutes façons, les résultats obtenus avec le chrysanthème indiquent que l'AG ne provoque pas la floraison en faisant produire par la plante une substance E. Par contre, il cause l'augmentation de la substance B dont le rôle n'est pas encore connu.

CHAPITRE XIX

CONTRIBUTION A LA PHYSIOLOGIE DE LA MONTAISON

Certaines espèces végétales produisent des tiges à entre-nœuds extrêmement courts, de sorte que les feuilles se trouvent tassées presque dans un même plan, formant une rosette. Le port de ces plantes change de façon spectaculaire lorsqu'elles vont fleurir.

A ce moment, en effet, les entre-nœuds nouvellement formés se mettent à s'allonger, espaçant ainsi largement les feuilles qui deviennent alors souvent plus étroites : on dit que la plante « monte ». Ce phénomène prend une ampleur particulière chez la rose-trémière dont la tige, après la montaison, peut atteindre 2 mètres de hauteur.

Les résultats que nous avons obtenus concernent deux points principaux : l'étude des variations des substances endogènes de croissance en fonction des divers stades de développement de la tige ou des conditions climatiques, et, d'autre part, l'étude particulière et l'isolement de la substance qui semble être liée directement au phénomène de montaison.

1. Variations des substances endogènes de croissance

a) *Variations de ces substances avec le phénomène de montaison.*— Les espèces que nous avons étudiées appartiennent à trois groupes physiologiques : espèces fleurissant en jours longs, espèces nécessitant une vernalisation et espèces fleurissant en jours courts.

Chez les espèces de jours longs étudiées (*Rudbeckia speciosa*, *Nicotiana sylvestris*), la plante reste à l'état de rosette tant qu'elle n'a subi que l'influence de jours courts. Après un certain nombre de jours longs, l'élongation de la tige commence à devenir visible. A ce moment, on trouve, dans les apex et les très jeunes feuilles, une nouvelle substance de croissance, la substance E.

Il en est de même pour les deux espèces nécessitant un traitement vernalisant pour devenir capable de monter et fleurir : le chrysanthème « Shuokan » et la rose-trémière bisannuelle. Dans ce dernier cas, nous avons même pu mettre en évidence une corrélation supplémentaire entre la présence de substance E et la montaison. En effet, il existe une race physiologique de rose-trémière qui est annuelle et qui n'a pas besoin de vernalisation pour monter et fleurir. L'étude chromatographique de la race annuelle a montré qu'elle contenait de la substance E sans traitement par le froid, alors que la race bisannuelle n'en contenait pratiquement pas dans ces conditions (fig. 16).

Parmi les plantes dont la floraison est déclenchée par les jours courts, nous avons étudié des exemples appartenant à plusieurs familles. Dans aucun des cas étudiés cependant, nous n'avons pu mettre en évidence l'apparition d'une nouvelle substance de croissance au moment de l'induction florale. Or il se trouve que toutes les espèces étudiées (*Nicotiana tabacum* var. « Maryland Mammoth », *Chrysanthemum morifolium* var. « Shasta », *Pharbitis Nil*, *Perilla crispa* et *Chenopodium rubrum*) sont des espèces normalement caulescentes à l'état végétatif dont le port ne change pas

de façon très spectaculaire lors du passage à l'état reproducteur. De fait, toutes ces espèces, sauf le chrysanthème « Shasta » (1), contiennent normalement, à l'état végétatif, une substance qui migre, sur les chromatogrammes, au Rf de la substance E. La quantité de substance E tend d'ailleurs à diminuer lorsque les plantes sont placées en jours courts.

On peut rapprocher de nos résultats ceux, moins complets, de plusieurs auteurs. C'est ainsi que Lang (1960) a trouvé que la variété annuelle de *Hyoscyamus niger* (plante de jours longs) produit une plus grande quantité d'une substance active sur le test maïs quand cette plante a été induite par les jours longs que lorsqu'elle reste à l'état de rosette végétative en jours courts. Chez la betterave, Margara (1960) a également mis en évidence une substance active comme l'acide gibbérellique sur le test maïs nain (mutants D-1 et D-5), mais sans déceler des différences qualitatives ou quantitatives entre le stade rosette et le stade de plante en train de monter. Enfin Tchaïlachian (9159) a pu extraire des substances induisant la floraison de *Rudbeckia bicolor* à partir de feuilles de tabac « Mammoth », de *Perilla* et de *Rudbeckia bicolor*, qu'il s'agisse de plantes élevées en jours courts ou en jours longs. Or nous n'avons pu démontrer la présence de substance E chez *Rudbeckia speciosa* qu'après l'induction photopériodique (voir Tableaux III et V). Les résultats assez confus de ces différents auteurs peuvent être la conséquence de plusieurs causes, par exemple, des méthodes d'extraction différentes des nôtres et aussi le fait de rechercher ces substances dans les feuilles plutôt que dans les apex. Or ce qui importe, c'est la présence de substances de croissance dans la zone apicale. C'est ainsi que Radley (cité par Brian, 1960) n'a guère trouvé de différence entre les teneurs en gibbérellines des *feuilles* de pois nain et de pois grimpant, alors qu'une différence nette existait dans les *bourgeons* terminaux.

En résumé, nous pouvons dire que les espèces que nous avons étudiées ne renferment pas de substance E dans le bourgeon terminal tant que la tige ne peut pas se développer autrement qu'en rosette. Lorsque ces plantes sont capables de devenir caulescentes, les bourgeons terminaux renferment une substance E. La présence de la substance E n'est pas liée à l'état florifère en général, mais à l'état de caulescence.

(1) Dans le cas du chrysanthème « Shasta », un inhibiteur masque la substance E sur les chromatogrammes. Cet inhibiteur étant une substance neutre, soluble dans l'éther, nous avons pu le retirer des extraits et faire apparaître alors une substance E sur les histogrammes. Ce résultat, cependant, a été irrégulier et ne s'est pas produit dans tous les essais.

b) *Variations des substances de croissance avec les conditions climatiques.* — Les variations des concentrations en substances de croissance qui ont été mises en évidence au cours de ce travail semblent être en corrélation avec la longueur du jour. D'une manière assez générale, on peut constater que la concentration en substances de croissance est plus grande en régime de jours longs qu'en régime de jours courts. C'est le cas, par exemple, de plantes de jours longs (*Rudbeckia*, *Nicotiana sylvestris*), mais aussi de plantes de jours courts (*Pharbitis*, *Perilla*). Il y a là, peut-être, un effet dû à la condition de jours longs plutôt qu'à la catégorie photopériodique de la plante considérée.

Lorsqu'on passe du régime de jours courts à celui de jours longs, c'est la substance C qui augmente la première chez *Rudbeckia speciosa* (fig. 4). Cette augmentation brutale (10 fois environ) d'une substance au Rf de l'acide 3-indolyl-acétique est à rapprocher de l'augmentation brusque de 3 fois, observée par Clark et Heath (1959), de la concentration en AIA chez l'oignon, une semaine environ après le début du traitement par les jours longs.

Chez *Nicotiana sylvestris* pourtant, c'est la substance B qui augmente la première, lors du transfert de la plante en régime de jours longs, pour atteindre son maximum 2 semaines après, comme chez le rudbeckia (fig. 5 et 8). Lorsqu'on étudie l'extrait méthanolique complet de l'oignon, et non pas seulement la fraction acide, soluble dans l'éther (comme l'ont fait Clark et Heath), on s'aperçoit que c'est une substance B dont l'augmentation est la plus spectaculaire lorsque la plante est mise en jours longs, du moins pour les variétés « Red Creole » et « Early Harvest » (Oyer, communication privée). Chez le tabac « Maryland Mammoth » pourtant, on assiste à un phénomène inverse lors du passage des jours longs en jours courts : ici encore c'est la substance B qui subit les plus fortes variations de concentration : mais elle *augmente* lors du transfert de la plante en journées courtes au lieu de diminuer (fig. 9).

Ainsi donc, bien que les jours longs tendent à augmenter le niveau des substances de croissance dans la majorité des cas étudiés (voir aussi Nitsch et Nitsch, 1959 a, pour les arbres), il existe cependant des cas où on observe le phénomène inverse.

2. Identité et propriétés des substances mises en évidence

Après avoir mis en évidence la présence et les variations des diverses substances de croissance au cours de la mise à fleur, nous nous sommes attaché à étudier plus particulièrement et à isoler celle qui semblait être en relation la plus directe avec le phénomène de montaison, c'est-à-dire la substance E. Néanmoins, on

trouvera ici les quelques indications que nous avons pu obtenir concernant les autres substances.

a) *Les substances A, B, C, D et F.* — Le Tableau XIV résume les indications que nous avons pu réunir concernant les diverses substances séparées par chromatographie. Ces résultats sont donnés sous toutes réserves, car nous n'avons pas eu le temps d'isoler ces composés. En particulier, les réactions colorées indiquées ont été faites sur les chromatogrammes des extraits bruts et peuvent être dues à des substances différentes des substances biologiquement actives migrant aux mêmes Rf.

On peut se demander si la substance B n'est pas du tryptophane. Cet acide aminé, en effet, agit positivement sur le test mésocotyle lorsqu'il se trouve en concentration égale ou supérieure à 200 γ/l. (Nitsch et Nitsch, 1958). Cependant, dans le cas du *Rudbeckia speciosa* tout au moins, la réaction colorée obtenue avec le réactif de Gordon et Weber est rose au lieu de jaune. De plus, le tryptophane monte au Rf 0,3 dans l'isopropanol à 70%, alors que la substance B reste au Rf 0,1-0,2 dans ce solvant.

De même, on pourrait penser que la substance C de rudbeckia est de l'acide 3-indolyl-acétique. Cependant, lorsqu'on essaye de l'extraire de la phase aqueuse à pH 3,0 avec de l'éther ou du chloroforme, on constate qu'elle reste dans la phase aqueuse, alors que l'AIA migre dans la phase organique. Il ne s'agit donc pas d'AIA libre.

A l'heure actuelle il ne nous est pas possible de donner plus de précisions sur la nature chimique des substances A, B, C, D et F.

Remarquons cependant que Vlitos et Meudt (1954) ont trouvé deux composés indoliques dans les feuilles de tabac « Maryland Mammoth ». Ces auteurs ont pensé que l'un était de l'acide 3-indolyl-pyruvique et l'autre du tryptophane. Plus tard, ces mêmes auteurs ont insisté sur le fait que le tabac ne contenait pas d'AIA (Vlitos et coll., 1956), mais un autre type d'auxine qui a été identifié plus tard comme étant un mélange de 1-docosanol et du sel de sodium d'un autre acide gras non saturé (Crosby et Vlitos, 1959). Kefford et Helms (1957), cependant, ont pu mettre en évidence de l'AIA dans les extraits de feuilles de tabac. Il serait donc possible que la substance B que nous avons mise en évidence chez le tabac « Maryland Mammoth » fût du tryptophane, mais des tests précis sont nécessaires pour éclaircir ce point. Enfin la substance E de ce tabac n'est certainement pas du 1-docosanol, car le 1-docosanol, malgré les premières affirmations de Crosby et Vlitos est inactif sur le test mésocotyle (Nitsch, communication privée).

b) *Les substances E.* — Si l'étude des substances A, B, C, D et F demande encore de nombreux efforts, nous sommes par-

TABLEAU XIV

Résumé des propriétés des substances A, B, C, D et F
(Résultats incomplets)

Substance	Plante	Rf (1) dans : isopropanol 80 %	Rf (1) dans : autres solvants	Réactions colorées : $KMnO_4$ (2)	Réactions colorées : Ehrlich (3)	Réactions colorées : G+W (4)	Fluorescence dans l'UV	Solubilité (5)
Tryptophane		0,15-0,25	0,3 (6)	jaune	violet	jaune	—	phase aqueuse (pH 3,0)
AIA		0,3 -0,4		jaune	violet	rose	—	phase éthérée (pH 3,0)
IAN		0,7 -0,8		jaune	violet	bleu	—	phase éthérée (pH 8,0)
IAE		0,8 -0,9		jaune	violet	ocre	—	phase éthérée (pH 8,0)
A	*Rudbeckia speciosa*	0,0 -0,1		—	violet	rose	bleu	
	Chrysanthème Shuokan	0,0 -0,1		jaune	—	—	jaune	
	Rose-trémière bisannuelle	0,0 -0,1 *		jaune	jaune pâle	—	—	
	Rose-trémière annuelle	0,0						
	Nicotiana sylvestris	0,0 -0,1 *						
	Nicotiana tabacum	0,0 -0,1						
	Chrysanthème Shasta	0,0 -0,1						
	Perilla crispa	0,0 -0,05						
	Chenopodium rubrum	0,0 -0,1						
B	*Rudbeckia speciosa*	0,1 -0,25	0,1-0,2 (6)	jaune	violet	rose	bleu pâle	phase aqueuse (pH 3,0)
	Chrysanthème Shuokan	0,1 -0,25		jaune	jaune foncé	jaune	—	phase aqueuse (pH 3,0)
	Rose-trémière bisannuelle	0,1 -0,25		—	—	—	bleu pâle	
	Rose-trémière annuelle.	0,1 -0,25						

	Nicotiana sylvestris	0,1 -0,2						
	Nicotiana tabacum.....	0,1 -0,25						
	Chrysanthème Shasta...	0,1 -0,3						
	Pharbitis Nil	0,05-0,25						
	Perilla crispa	0,1 -0,25						
	Chenopodium rubrum...	0,1- 0,25						
C	*Rudbeckia speciosa*.....	0,25-0,45		jaune	—	rose	mauve	phase aqueuse (pH 3,0)
	Chrysanthème Shuokan	0,25-0,4		—	violet	rose	—	
	Rose-trémière bisannuelle	0,25-0,45		—	violet	rose	—	
	Rose-trémière annuelle	0,3 -0,5						
	Nicotiana sylvestris	0,25-0,4						
	Chrysanthème Shasta...	0,3 -0,4						
	Pharbitis Nil	0,25-0,35						
	Perilla crispa	0,25-0,45						
	Chenopodium rubrum...	0,25-0,35						
D	*Rubdeckia speciosa*	0,5 -0,65		—	—	—	—	
	Chrysanthème Shuokan	0,4 -0,55		—	—	rose	—	
	Rose-trémière bisannuelle	0,4 -0,55		jaune	—	—	—	
	Nicotiana sylvestris	0,4 -0,55						
	Chrysanthème Shasta...	0,45-0,65 *						
	Pharbitis Nil	0,4 -0,5						
	Chenopodium rubrum ..	0,4 -0,5						
F	*Rudbeckia speciosa*	0,9 -1,0						

(1) Chromatographie ascendante.
(2) Solution aqueuse à 0,5 % de $KMnO_4$.
(3) p-Diméthyl-aminobenzaldéhyde 1 g, HCl 8,6 cc, H_2O 1,4 cc, éthanol absolu 40 cc.
(4) Gordon et Weber : $FeCl_3.6H_2O$ 27 mg, $HClO_4$ (70 %) 5 cc, H_2O 5 cc, éthanol (95 %) 10 cc.
(5) Fractionnement entre éther déperoxydé et eau au pH indiqué.
(6) Dans l'isopropanol à 70 %.
(*) Observé rarement.

venus, par contre, à cristalliser la substance E de rose-trémière et à en déterminer certaines propriétés physico-chimiques et biologiques. Les propriétés physiologiques de la substance E de rose-trémière se trouvent résumées dans le Tableau XV et comparées

TABLEAU XV

Récapitulation des propriétés physiologiques de la substance E de rose-trémière.

Tests	Substance E	Auxines	Gibbérellines	Kinines
Mésocotyle.....	+	++	+	0
Avena (courbure)..	0	++	0	0
Topinambour	+	++	0	0
Enracinement ...	0	++	0	—
Maïs nain.....	+	0	++	0
Germination (laitue)	0	—	++	+
Moëlle de tabac ..	0	0	0	++
Floraison (rudbeckia).....	+	0	+	0
Montaison (rose-trémière)..	+	?	+	?

0 = aucune action ; + = action positive ; ++ = action forte ; — = inhibition ; ? = non essayé.

à celles des auxines (type AIA), des gibbérellines (type AG) et des kinines (types 6-furfuryl-aminopurine). On voit ainsi que la substance E possède certaines des propriétés des auxines (action

TABLEAU XVI

Activités physiologiques comparées de trois substances E.

Provenance	Elongation (mésocotyles)	Maïs main (Dwarf-1)	Germination (laitue)	Floraison (rudbeckia)
Rose-trémière	+	+	0	+
Rudbeckia	+	+	+	+
Chrysanthème..... « Shuokan » ...	+	+	+	?

+ = action positive sur le test indiqué ; 0 = aucune action ; ? = non essayé.

sur les tests mésocotyle et topinambour), mais non pas toutes, et certaines des propriétés des gibbérellines (en particulier sur le test maïs nain), mais non pas toutes (inactivité sur le test laitue).

Les propriétés physiologiques des substances E de rudbeckia, de chrysanthème « Shuokan » et de rose-trémière sur quatre tests biologiques ont été comparées dans le Tableau XVI. Presque toutes les propriétés sont identiques, qualitativement du moins, sauf l'effet de stimulation sur la germination des graines de laitue qui ne semble pas exister dans le cas de la substance E de rose-trémière. Enfin, à cause du manque de matériel, la substance E de rose-trémière n'a pu être essayée sur le chrysanthème « Shuokan ». Les résultats de ce tableau ne permettent pas d'affirmer que les trois substances E soient identiques, bien qu'elles puissent être de natures très voisines. Comme à l'habitude, notre travail n'a pu résoudre tous les problèmes qu'il a soulevés. Il a, du moins, pu démontrer qu'il existait des substances de montaison. D'autres seront sans doute isolées et identifiées par la suite.

RÉSUMÉ

Le travail qui vient d'être présenté a abouti aux résultats suivants :

I. Transmission d'un stimulus floral

Le stimulus floral d'un chrysanthème peut être transmis par greffage, sauf lorsque le greffon à induire appartient à une variété qui a besoin d'être vernalisée. L'état de non-vernalisation, chez de telles variétés, empêche absolument l'induction florale.

Il en est de même pour des bourgeons non vernalisés de rose-trémière bisannuelle, lorsqu'ils sont greffés sur des racines de plantes vernalisées.

Le stimulus floral n'a pu être transmis par une cuscute (*Cuscuta Gronovii*), dans le cas de *Chrysanthemum morifolium* var. « Honeysweet », *Xanthium pennsylvanicum* et *Perilla crispa*.

II. Role indirect de l'acide gibbérellique dans la mise a fleur

L'acide gibbérellique peut provoquer la floraison de la variété de chrysanthème « Shuokan », mais non pas celle de la variété « Honeysweet ». Cependant, si on greffe la variété « Honeysweet » sur la variété « Shuokan » traitée à l'acide gibbérellique, on provoque la floraison du greffon aussi bien que celle de la plante traitée directement. Ainsi, l'acide gibbérellique est capable de provoquer *indirectement* la floraison du chrysanthème « Honeysweet ».

III. Variations des substances endogènes de croissance au cours de l'induction florale

L'analyse chromatographique des substances de croissance dans les bourgeons terminaux a permis de séparer plusieurs substances différentes, actives sur le test mésocotyle. Parmi elles, les niveaux des substances appelées B et C varient fortement dans la plupart des cas étudiés, qu'il s'agisse de plantes de jours longs (*Rudbeckia speciosa*, *Nicotiana sylvestris*), de plantes de jours

courts (*Nicotiana tabacum*, var. « Maryland Mammoth », chrysanthème « Shasta », *Pharbitis Nil*, *Perilla crispa*, *Chenopodium rubrum*) ou de plantes nécessitant un traitement vernalisant (chrysanthème « Shuokan » et rose-trémière bisannuelle).

Chez les plantes en rosette apparaît dans les apex, peu avant le début de l'élongation de la tige, une substance nouvelle, appelée substance E.

IV. Isolement de la substance E

La substance E a été extraite et cristallisée à partir de bourgeons et de jeunes feuilles de roses-trémières bisannuelles vernalisées (5,5 mg de cristaux à partir de 2400 apex (1,5 kg) et de 7,6 kg de jeunes feuilles). Point de fusion $>$ 290°C (décomp. à 300°). Les spectres infra-rouge et ultra-violet indiquent que la substance E n'est ni un composé indolique ni une gibbérelline. Elle contient moins de 5% d'azote.

V. Propriétés physiologiques de quelques substances E

La substance E de rose-trémière est active sur le test mésocotyle et sur le test topinambour (comme une auxine), mais inactive sur le test *Avena* classique ou sur un test d'enracinement. Elle est active sur trois mutants nains de maïs (Dwarf-1, -3 et -5) comme les gibbérellines, mais inactive sur le test de germination des graines de laitue. Elle provoque la montaison (mais non la floraison) de roses-trémières bisannuelles non vernalisées et la floraison du *Rudbeckia speciosa* en jours courts.

La substance E de *Rudbeckia speciosa* (purifiée par chromatographie, mais non cristallisée) provoque la floraison de cette plante en jours courts. Elle est active (comme les gibbérellines) sur le test mésocotyle d'avoine, sur l'élongation de la première feuille d'avoine, sur le test maïs nain (Dwarf-1) et sur la germination des graines de laitue à l'obscurité totale.

La substance E de chrysanthème « Shuokan » (purifiée par chromatographie, mais non cristallisée) provoque la floraison de « Shuokan » non vernalisés. Elle est également active sur le test mésocotyle, sur le test maïs nain (Dwarf-1) et sur la germination des graines de laitue à l'obscurité complète.

Les trois substances E ont donc des propriétés physiologiques très voisines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allard (H.A.), 1919. — Gigantism in *Nicotiana tabacum* and its alternative inheritance. *Amer. Naturalist*, **53** : 218-233.

Baldev (B.), 1960. — *In vitro* responses of growth and development in *Cuscuta reflexa* Roxb. *Phytomorphology*, **9** : 316-319.

Bennett (C.W.), 1944. — Studies of dodder transmission of plant viruses. *Phytopathology*, **34** : 905-932.

Bonner (J.) et Bonner (D.), 1948. — Notes on induction of flowering in *Xanthium*. *Bot. Gaz.*, **110** : 154-155.

Bonner (J.) et Bandurski (R.-S.), 1952. — Studies on the physiology, pharmacology and biochemistry of the auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **3** : 71-75.

Borthwick (H.A.), 1947. — Day length and flowering. The 1943-47 yearbook of agriculture, pp. 273-283.

Borthwick (H.A.), Parker (M.W.) et Hendricks (S.B.), 1950. — Recent developments in the control of flowering by photoperiod. *Amer. Naturalist*, **84** : 117-134.

Borthwick (H.A.) et Hendricks (S.B.), 1961. — Effects of radiation on growth and development. *Encycl. of Plant Physiol.*, ed. W. Ruhland, XVI : 299-330.

Brian (P.W.), 1960. — Les gibbérellines : un nouveau groupe d'hormones végétales. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, **6** : 107-117.

Carr (D.J.), 1952. — The photoperiodic behaviour of short-day plant. *Physiol. plant.*, **5** : 70-84.

Carr (D.J.) et Melchers (G.), 1954. — Auslösung von Blütenbildung bei der Kurztagpflanze *Kalanchoë blossfeldiana* in Langtagbedingungen durch Pfropfpartner. *Zeitschr. Naturf.*, **9** b : 216-218.

Cholodny (N.G.), 1939. — The internal factors of flowering. *Herb. Revs.*, **7** : 223-247.

Chouard (P.), 1960. — Vernalization and its relations to dormancy. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **11** : 191-238.

Clark (J.E.) et Heath (O.V.S.), 1959. — Auxin and the bulbing of onions. *Nature*, **184** : 345-347.

Cooke (A.R.), 1954. — Changes in free auxin content during the photoinduction of short-day plants. *Plant Physiol.*, **29** : 440-444.

Crosby (D. G.) et Vlitos (A. J.), 1959 (1961). — New auxins from « Maryland Mammoth » tobacco. « Plant Growth Regulation », *Iowa State Univ. Press.*, Ames, Iowa, U.S.A., pp. 57-69.

Cumming (B.G.), 1959. — Extreme sensitivity of germination and photoperiodic reaction in the genus *Chenopodium* (Tourn.) L. *Nature*, **184** : 1044-1045.

DENFFER (D. von), 1950. — Blühhormon oder Blühhemmung ? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. *Naturw.*, **37** : 296-301 ; 317-321.

GARNER (W.W.) et ALLARD (H.A.), 1920. — Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Jour. Agr. Res.*, **18** : 553-606.

GASSNER (G.), 1918. - Beiträge zur physiologischen Charakteristik sommer und winterannueller Gewächse, insbesondere der Getreidepflanzen. *Zeitschr. Bot.*, **10** : 417-480.

GREGORY (F.G.), 1948. — The control of flowering in plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **2** (Growth) : 75-103.

HABER (A.H.) et TOLBERT (N.E.), 1959. — Effects of gibberellic acid, kinetin, and light on the germination of lettuce seed. « Photoperiodism and related phenomena in plants and animals » ed. R.B. Withrow. *Amer. Asso. Adv. Sci.*, Washington, D.C., U.S.A., pp. 197-206.

HAMNER (K.C.), 1944. — Photoperiodism in plants. *Ann. Rev. Biochem.*, **13** : 575-590.

HAMNER (K.C.), 1948 a. — Factors governing the induction and development of reproductive structures in plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **2** (Growth) : 104-116.

HAMNER (K.C.), 1948 b. — Hormones in relation to vernalization and photoperiodism. « Vernalization and photoperiodism » ed. A.E. Murneek and R.O. Whyte. *Chron. Bot. Co.*, Waltham, Mass. U.S.A., pp. 63-70.

HAMNER (K.C.) et BONNER (J.), 1938. — Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. *Bot. Gaz.*, **100** : 388-431.

HARADA (H.), 1958. — Changes in endogenous growth substances during flower development and effects of synthetic substances on flowering. *Master's thesis*, Cornell Univ., U.S.A., 119 pages.

HARADA (H.), 1960. — Extraction de deux substances de floraison. *Ann. Physiol. Vég.*, **2** : 249-254.

HARADA (H.) et NITSCH (J. P.), 1959 a. — Extraction d'une substance provoquant la floraison chez *Rudbeckia speciosa* Wend. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **106** : 451-454.

HARADA (H.) et NITSCH (J. P.), 1959 b. — Flower induction in Japanese chrysanthemums with gibberellic acid. *Science*, **129** : 777-778.

HARADA (H.) et NITSCH (J. P.), 1961. — Isolement et propriétés physiologiques d'une substance de montaison. *Ann. Physiol. Vég.* **3** : 193-208.

HARDER (R.) et SPRINGORUM (B.), 1947. — Beobachtungen über Metaplasin- und Blühhormon - Wirkungen bei *Rudbeckia*. *Biologisches Zentralbl.*, **66** : 147-165.

HESS (C.), 1957. — A physiological analysis of rooting in cuttings of juvenile and mature *Hedera helix* L. Ph. D. thesis, Cornell Univ., U.S.A., 148 pages.

HESS (C.), 1961. — The mung bean bioassay for the detection of root promoting substances. *Plant Physiol.*, **36** (suppl.) : XXI.

IKUMA (H.) et THIMANN (K.V.), 1960. — Action of gibberellic acid on lettuce seed germination. *Plant Physiol.*, **35** : 557-566.

JABLONSKI (J.R.) et SKOOG (F.), 1954. — Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, **7** : 16-24.

KAHN (A.), GOSS (J.A.) et SMITH (D.E.), 1957. — Effect of gibberellin on germination of lettuce seed. *Science*, **125** : 645.

KEFFORD (N.P.) et HELMS (K.), 1957. — Indoleacetic acid in two species of *Nicotiana*. *Nature*, **179** : 679.

KLEBS (G.), 1913. — Physiologie der Fortpflanzung., 7. Physiologie. Handwörterbuch *Naturwiss.*, **4** : 276-296.

KLEBS (G.), 1918. — Über die Blütenbildung von *Sempervivum*. *Flora*, **111/112** : 128-151.

KNOTT (J.E.), 1934. — Effect of localized photoperiod on spinach. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **31** : 152-154.

KONISHI (M.), 1956. Studies on development of flowering stalks in long-day plants in relation to auxin metabolism. *Memoir of Col. Agr., Kyoto Univ.*, n° **75**, pp. 1-70.

KRAUS (E.J.), et KRAYBILL (H.R.), 1918. — Vegetation and reproduction with special reference to the tomato. *Oregon Agr. Coll. Exp. Sta. Bull.*, **149** : 1-90.

KRUZHILIN (A.S.) et SHVEDSKAYA (Z.M.), 1960. — Rôle des feuilles dans la vernalisation des plantes d'hiver et bisannuelles (en russe, traduction française). *Fisiol. Rast.*, **7** : 287-295.

KUYPER (J.) et WIERSUM (L.K.), 1936. — Occurrence and transport of a substance causing flowering in the soya bean. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* (Amsterdam), **39** : 1114-1122.

LANG (A.), 1942. — Beiträge zur Genetik des Photoperiodismus. I. Faktorenanalyse des Kurztagcharakters von *Nicotiana tabacum* « Maryland Mammoth ». *Z. indukt. Abstamm. und Vererb. Lehre* **80** : 210-219.

LANG (A.), 1952. — Physiology of flowering. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **3** : 265-306.

LANG (A.), 1960. — Gibberellin-like substances in photoinduced and vegetative *Hyoscyamus* plants. *Planta*, **54** : 498-504.

LANG (A.), 1961. — Auxins in flowering. *Encycl. Plant Physiol.* ed. W. Ruhland, XIV : 909-950.

LANG (A.), SANDOVAL (J.A.) et BEDRI (A.), 1957. — Induction of bolting and flowering in *Hyoscyamus* and *Samolus* by a gibberellin-like material from a seed plant. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S.A., **43** : 960-964.

LARSEN (P.), 1955. — On the separation of acidic and non acidic auxins. *Physiol. Plant.*, **8** : 343-357.

LEOPOLD (A.C.), 1949. — Flower initiation in total darkness. *Plant Physiol.*, **24** : 530-533.

LEOPOLD (A.C.), 1951. — Photoperiodism in plants. *Quart. Rev. Biol.*, **26** : 247-263.

LINCOLN (R.G.), MAYFIELD (D.L.) et CUNNINGHAM (A.), 1961. — Preparation of a floral initiating extract from *Xanthium*. *Science* **133** : 756.

LIVERMAN (J.L.), 1955. — The physiology of flowering. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **6** : 177-210.

LJUBIMENKO (J.A.) et BUSLOVA (E.D.), 1937. — Contribution à la théorie du photopériodisme. II (en russe, traduction française). *C.R.* (Doklady) *Acad. Sci.* U.R.S.S., **14** : 149-152.

LOCKHART (J.A.), 1961. — Mechanism of the photoperiodic process in higher plants. *Encycl. of Plant Physiol.* ed. W. Ruhland, XVI : 390-438.

LONA (F.), 1948. — La fioritura della brevidiurna *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. coltivata in soluzione nutritizia con saccarosio, in assenza di stimolo fotoperiodico euflorigeno. *Nuovo Giorn. Botan. Ital.*, **56** : 559-562.

LONA (F.), 1957. — Azione gibberellinosimile di estratti ottenuti da giovani strutture fiorali di *Brassica Napus* L. var. *Oleifera*. *L'Ateneo Parmense*, **28** : 111-115.

MARGARA (J.), 1960. — Recherches sur le déterminisme de l'élongation et de la floraison dans le genre *Beta*. Thèse de doctorat ès sciences naturelles. Paris, 117 pages.

MELCHERS (G.), 1936. — Versuche zur Genetik und Entwicklungsphysiologie der Blühreife. *Biol. Zentralbl.*, **56** : 567-570.

MELCHERS (G.), 1937. — Die Wirkung von Genen, tiefen Temperaturen und blühenden Pfropfpartnern auf die Blühreife von *Hyoscyamus niger* L., *Biol. Zentralbl.*, **57** : 568-614.

MELCHERS (G.), 1939. — Die Blühhormone. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, **57** : 29-48.

MELCHERS (G.) et LANG (A.), 1941. — Weitere Untersuchungen zur Frage der Blühhormone. *Biol. Zentralbl.*, **61** : 16-39.

MOSHKOV (B.S.), 1936 a. — The role of leaves in the photoperiodic response of plants. *Trudy prikl. Bot. Genet. i selekcii.* Ser. A., **17** : 25-30, Ref. : *Herb. Abstr.*, **6** : 204, 1936.

MOSHKOV (B.S.), 1936 b. — Photoperiodic response of leaves and its utilization in grafting. *Trudy prikl. Bot. Genet. i Selekcii.* Ser. A., **19** : 107-126, Ref. : *Herb. Abstr.*, **7** : 326, 1937.

MOSHKOV (B.S.), 1937. — Blooming of short-day plants in a condition of continuous illumination as a result of grafting. *Trudy Prikl. Bot. Genet. i. Selekcii.* Ser. A, **21** : 145-156 ; Rel. : *Herb. Abstr.*, **8** : 135, 1938.

MURAKAMI (Y.), 1961. — Paper-chromatographic studies on change in gibberellins during seed development and germination in *Pharbitis Nil. Bot. Mag.*, Tokyo, **74** : 241-247.

MURNEEK (A.E.), 1940. — Length of day and temperature effects in *Rudbeckia. Bot. Gaz.*, **102** : 269-279.

MURNEEK (A.E.), 1953. — History of research in photoperiodism. « Vernalization and photoperiodism » ed. A.E. Murneek and R.O. Whyte. *Chron. Bot. Co.*, Waltham, Mass., U.S.A., pp. 149-178.

NAKAYAMA (S.), 1958. — Studies in the dark process in the photoperiodic response of *Pharbitis* seedlings. The science reports of the Tohoku Univ. (Japon), Fourth series, *Biology*, Vol. **24**, nº 4.

NAYLOR (A.W.), 1953. — Reactions of plants to photoperiod. « Growth and differentiation in plants », ed. W.E. Loomis, *Iowa State. Coll. Press.* Ames, Iowa, U.S.A., pp. 149-178.

NAYLOR (A.W.), 1961. — The photoperiodic control of plant behavior. *Encycl. of Plant Physiol.* ed. W. Ruhland, XVI : 331-389.

NITSCH (J. P.), 1955. — Methods for the investigation of natural auxin and growth inhibitors. « The chemistry and mode of action of plant growth substances » ed. R.L. Wain and F. Wightman. *Butterworth Scientific Publications*, London, pp. 3-31.

NITSCH (J. P.), 1958 (1961). — The regulation of plant growth and flowering through chemical substances. « Advances in Hortic. Sci. », I : 55-65.

NITSCH (J. P.), 1961. — Naturally-occurring growth substances in relation to plant tissue culture. In : symposium on plant tissue and organ culture. Dehli, Inde (sous presse).

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1955. — The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. *Beitr. Biol. Pfl.*, **31** : 387-408.

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1956 a. — Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiol.*, **31** : 94-111.

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1956 b. — Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. I. *Amer. Jour. Bot.*, **43** : 839-851.

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1957. — Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. II. Organic nitrogenous compounds. *Amer. Jour. Bot.*, **44** : 555-564.

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1958. — Activité de quelques composés indoliques sur le test « mésocotyle ». *Bull. Soc. Bot. France*, **105** : 482-490.

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). 1959 a. — Photoperiodic effects in woody plants : Evidence for the interplay of growth-regulating substances. « Photoperiodism and related phenomena in plants and animals ». ed. R.B. Withrow. *Ame. Assoc. Adv. Sci.*, Washington D.C., U.S.A., pp. 225-242.

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1959 b. — Modification du métabolisme des auxines par l'acide gibbérellique. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, **5** : 20-23.

NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1962 — Activités comparées de neuf gibbérellines sur trois tests biologiques. *Ann. Physiol. Vég.*, **4** (en préparation).

OKADA (M.), 1955. — Culture précoce des chrysanthèmes (en japonais). *Agr. et Hort.*, **30** : 1597-1601.

OKADA (M.), 1957. — Classification of chrysanthemum varieties in view of their environmental responses to flowering (en japonais avec résumé en anglais). *Jour. Hort. Assoc. Japan*, **26** : 59-72.

OKUDA (M.), 1954. — Flower formation of *Xanthium canadense* under long day conditions induced by grafting with long-day plants. *Bot. Mag.*, Tokyo, **66** : 247-255.

OVERBEEK (J. Van), RACUSEN (D.W.), TAGAMI (M.) et HUGHES (W.J.), 1957. — Simultaneous analysis of auxins and gibberellins. *Plant Physiol.*, **32** (suppl.) : XXXII.

PARKER (M.W.) et BORTHWICK (H.A.), 1950. — Influence of light on plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1** : 43-58.

PHINNEY (B.O.), 1956. — Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S.A., **42** : 185-189.

PHINNEY (B.O.), 1961. — Dwarfing genes in *Zea mays* and their relation to the gibberellins. « Plant Growth Regulation », *Iowa State Univ. Press.* Ames, Iowa, U.S.A., pp. 489-501.

PHINNEY (B.O.), WEST (C.A.), RITZEL (M.) et NEELY (P.M.), 1957. — Evidence for « gibberellin-like » substances from flowering plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S.A., **43** : 398-404.

PURVIS (O.N.), 1961. — The physiological analysis of vernalisation. *Encycl. of Plant Physiol.*, ed. W. Ruhland, XVI : 76-122.

REINHARD (E.) et LANG (A.), 1961. — Natural gibberellins in *Hyoscyamus niger* in relation to development especially to flower formation. *Plant Physiol.*, **36** (suppl.) : XII-XIII.

RESENDE (F.), 1949. — Auxin and antiauxin, the hormones responsible for the change of the vegetative into floral phenotypes. *Bull. Soc. Portug. Cienc. Nat., Ser.* 2a, **2** : 174-188.

RESENDE (F.), 1954. — Transmission of the floral state from an « epibiont-inflorescence » (S.D.P.) to a vegetative hypobiont (LSDP) in LD. *Biol. Soc. Portug. Cienc. Nat., Ser.* 2a, **5** : 70-71.

RESENDE (F.), 1955. Gradaçao floral e comportamento das PDLC na transmissao do estado floral entre « donor » e « acceptor » (*Bryophyllum* e *Kalanchoë*). *Portug. Acta Biol.*, Ser. A, **4** : 272-296.

ROBERTS (R.H.), 1951. — The induction of flowering with a plant extract. « Plant Growth Substances » ed. F. Skoog. *The University of Wisconsin Press.*, U.S.A.

ROBERTS (R.H.), 1959. — The flowering hormone. *Plant Physiol.*, **32** (suppl.) : VII.

ROBERTS (R.H.) et STRUCKMEYER (B.E.), 1961. — Induction of flowering by natural lipid hormones. *Plant Physiol.*, **36** (suppl.) : LIII.

SACHS (J.), 1865. — Wirkung des Lichts auf die Blüthenbildung unter Vermittlung der Laubblätter. *Bot. Zeitz.*, **23** : 117-121, 125-131, 133-139 ; Ref. : Naylor, A.W., 1961. The photoperiodic control of plant behavior. *Encycl. Plant Physiol.* ed. W. Ruhland, XVI : 331-389, 1961.

SALISBURY (F.B.), 1955. — The dual role of auxin in flowering. *Plant Physiol.*, **30** : 327-334.

SALISBURY (F.B.), 1958. — The flowering process. *Scientific American*, pp. 109-117 (avril).

SALISBURY (F.B.), 1961. — Photoperiodism and the flowering process. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **12** : 293-326.

SCHWABE (W.W.), 1954. — Factors controlling flowering in the chrysanthemum. IV. The site of vernalisation and translocation of the stimulus. *Jour. Exp. Bot.*, **5** : 389-400.

SIRONVAL (C.), 1954. — Sur le chimisme propre à l'accomplissement de la photophase et sur l'existence d'extraits favorisant la formation de fleurs. VIII[e] Congrès Int. Bot., Rapp. et Commun., Sect. XI : 328-329.

SKINNER (C.G.), TALBERT (F.D.) et SHIVE (W.). 1958. — Effect of 6- (substituted) purines and gibberellin on the rate of seed germination. *Plant Physiol.*, **33** : 190-194.

TAKIMOTO (A.) et IKEDA (K.), 1959 a. — Studies on the light controlling flower initiation of *Pharbitis Nil.* I. Intensity and quality of the light preceding the inductive dark period. *Bot. Mag.*, Tokyo, **72** : 137-145.

TAKIMOTO (A.) et IKEDA (K.), 1959 b. — Studies on the light controlling flower initiation of *Pharbitis Nil.* III. Light-sensitivity of the first process of inductive dark period. *Bot. Mag.*, Tokyo, **72** : 388-396.

TAKIMOTO (A.) et IKEDA (K.), 1959 c. — Studies on the light controlling flower initiation of *Pharbitis Nil.* IV. Further studies on the light preceding by inductive dark period. *Bot. Mag.*, Tokyo, **73** : 37-43.

TAKIMOTO (A.) et IKEDA (K.), 1959 d. — Studies on the light controlling flower initiation of *Pharbitis Nil.* V. On the light following the inductive dark period. *Bot. Mag.*, Tokyo, **73** : 91-97.

TASHIMA (Y.) et IMAMURA (S.), 1953. — Flower initiation in total darkness in *Pharbitis Nil.* Chois., a short day plant. *Proc. Imp. Acad. Jap.*, **29** : 581-585.

TCHAÏLACHIAN (M. Ch.), 1936 a. — On the hormonal theory of plant development. (en russe, traduction anglaise). *C.R.* (Doklady) *Acad. Sci.*, U.R.S.S., **12** : 443-447.

TCHAÏLACHIAN (M.Ch.), 1936 b. — New facts in support of the hormonal theory of plant development (en russe, traduction anglaise). *C.R.* (Doklady) *Acad. Sci.*, U.R.S.S., **13** : 79-83.

TCHAÏLACHIAN (M. Ch.), 1937. — Concerning the hormonal nature of plant development (en russe, traduction anglaise). *C.R.* (Doklady) *Acad. Sci.*, U.R.S.S., **16** : 227-230.

TCHAÏLACHIAN (M. Ch.), 1958 a. — Facteurs hormonaux de floraison des plantes (en russe, traduction française). *Fiziol. Rast.*, **5** : 541-560.

TCHAÏLACHIAN (M. Ch.), 1958 b. — Induction photopériodique de feuilles isolées (en russe, traduction française). *C.R.* (Doklady) *Acad. Sci.*, U.R.S.S., **118** : 197-200.

TCHAÏLACHIAN (M. Ch.) et LOJNIKONA (V.N.), 1959. — Influence des substances extraites de feuilles de diverses plantes et analogues à la gibbérelline, sur la croissance et la floraison du *Rudbeckia.* (en russe, traduction française). *C.R.* (Doklady) *Acad. Sci.*, U.R.S.S., **128** : 1309-1312.

VLITOS (A.J.) et MEUDT (W.), 1954. — The role of auxin in plant flowering. III. Free indole acids in short-day plants grown under photoinductive and nonphotoinductive daylength. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **17** : 413-417.

VLITOS (A.J.), MEUDT (W.) et BEIMLER (R.), 1956. — The role of auxin in plant flowering. IV. A new unidentified naturally occurring indole hormone in normal and gamma irradiated Maryland Mammoth tobacco. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **18** : 283-293.

WELLENSIEK (S.J.), DOORENBOS (J.) et ZEEUW (D. de), 1954. — The mechanism of photoperiodism. VIII[e] Congrès Int. Bot., Rapp. et Commun., Sect. XI et XII : 307-315.

WELLENSIEK (S.J.), DOORENBOS (J.) et ZEEVAART (J.A.D.), 1956. — L'action du froid dans le processus de la vernalisation. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, **2** : 1-8.

WENT (F.W.), 1926. On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* (Amsterdam), **30** : 10-19.

WENT (F.W.), 1928. — Wuchsstoff und Wachstum. *Rec. Trav. Bot. Neerl.*, **25** : 1-116.

WENT (F.W.) et THIMANN (K.V.), 1937. — Phytohormones. *MacMillan Co.*, U.S.A., 294 pages.

WHYTE (R.O.), 1948. — History of research in vernalization. « Vernalization and photoperiodism » ed. A.E. Murneek and R.O. Whyte. *Chron. Bot. Co.*, Waltham, Mass., U.S.A., pp. 1-38.

WYCHERLEY (P.R.), 1952. — Temperature and photoperiod in relation to flowering in three perennial grass species. *Meded. Landbouwhoogesch.*, Wageningen, **52** : 75-92.

ZEEUW (D. de), 1953. — Flower initiation and light intensity in *Perilla*. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* (Amsterdam), Ser. C., **56** : 418-422.

ZEEUW (D. de) et LEOPOLD (A.C.), 1956. — The promotion of floral initiation by auxin. *Ame Jour. Bot.*, **43** : 47-50.

ZEEVAART (J.A.D.), 1957. — Flowering by means of grafting. III. Translocation of floral stimulus through day-neutral interstock. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* (Amsterdam), Ser. C., **60** : 523-530.

ZEEVAART (J.A.D.), 1958. — Flower formation as studied by grafting. Thèse (Wageningen), 88 pages.

ZHDANOVA (L.P.), 1945. — Geotropic reaction of leaves and content of growth hormone in plants. (en russe, traduction anglaise). *C.R.* (Doklady) *Acad. Sci.*, U.R.S.S., **49** : 62-65.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos 5

PREMIÈRE PARTIE :

Introduction et historique : la notion de substance de floraison. 7

Chapitre premier. — *La naissance de l'idée de l'existence d'une substance de floraison* 7

Chapitre II. — *Les cas antérieurement publiés d'extraction de substances de floraison* 10

Chapitre III. — *Récentes expériences de greffage.* 12

DEUXIÈME PARTIE :

Expériences sur la transmissibilité de l'induction florale. 15

Chapitre IV. — *Essais de transmission par greffage.* 15

1. *Chrysanthemum morifolium* Ram. 15
2. *Althaea rosea* Cav. 19

Chapitre V. — *Essai de transmission par le* Cuscuta Gronovii *Willd.* 20

Chapitre VI. — *Discussion et conclusions.* 21

1. Expériences sur les chrysanthèmes. 21
2. Expériences sur les roses-trémières. 23
3. Expériences avec la cuscute. 23

TROISIÈME PARTIE :

Variation des substances de croissance du type auxine et gibbérelline au cours de la mise a fleur 25

Chapitre VII. — *Techniques.* 25

1. Matériel végétal. 25
2. Préparation des échantillons 26
3. Méthodes d'extraction 26
4. Chromatographie 27
5. Tests biologiques. 27
6. Valeur statistique de la méthode employée. 28

Chapitre VIII. — *Variations des substances de croissance chez des plantes de jours longs.* 30

1. *Rudbeckia speciosa* Wend. 30
2. *Nicotiana sylvestris* Spegaz. et Comes. 35

Chapitre IX. — *Variations des substances de croissance chez des plantes de jours courts.* 38

1. *Nicotiana tabacum* L. (variété Maryland Mammoth)..... 38
2. *Chrysanthemum morifolium* Ram. (variété Shasta)..... 39
3. *Pharbitis Nil* Chois., *Perilla crispa* (Thunb.) Tanaka, *Chenopodium rubrum* L. 43

Chapitre X. — *Variations des substances de croissance chez des plantes nécessitant un traitement par le froid.* 44

1. *Chrysanthemum morifolium* Ram. (variété Shuokan).... 44
2. *Althaea rosea* Cav. (variété Fordhook Giant Double Scarlet). 46

Chapitre XI. — *Variations des substances de croissance chez des plantes induites à fleurir par l'acide gibbérellique* (Chrysanthème Shuokan). 50

Chapitre XII. — *Discussion et conclusions* 51

1. Le cas des plantes de jours longs et de celles nécessitant une vernalisation 51
2. Le cas des plantes de jours courts. 52
3. Le cas de l'induction florale par l'acide gibbérellique. 53

QUATRIÈME PARTIE :
Etude des substances « E » 55
Chapitre XIII. — *Les tests biologiques* 55
1. Le test *Avena* 55
2. Le test topinambour. 56
3. Test d'enracinement. 56
4. Le test « maïs nain ». 56
5. Le test de germination des graines de laitue. 57
6. Le test de Skoog modifié 58
7. Test de floraison. 58
Chapitre XIV. — *La substance E de rudbeckia.* 59
1. Extraction et purification 59
2. Action sur la première feuille d'avoine. 60
3. Action sur le test « maïs nain ». 61
4. Action sur la germination des graines de laitue. 62
5. Action sur la floraison. 63
6. Conclusions 65
Chapitre XV. — *La substance E du chrysanthème « Shuokan »* ... 65
1. Extraction et purification. 65
2. Action sur le test « maïs nain ». 65
3. Action sur la germination des graines de laitue 67
4. Action sur la floraison. 67
5. Conclusions 68
Chapitre XVI. — *La substance E de la rose-trémière : isolement et propriétés physico-chimiques.* 68
1. Extraction du matériel végétal. 69
2. Purification des extraits :
a) Essais préliminaires 69
b) Méthode utilisée 70
3. Propriétés physico-chimiques de la substance E cristallisée. 71
Chapitre XVII. — *La substance E de la rose-trémière : propriétés biologiques.* 74
1. Action sur le test mésocotyle 74
2. Action sur le test *Avena* 75
3. Action sur le test topinambour. 75
4. Action sur l'enracinement 76
5. Action sur le test « maïs nain ». 77
6. Action sur la germination des graines de laitue 78
7. Action sur la montaison. 78
8. Action sur la floraison. 80
9. Action sur le test moëlle de tabac. 81
10. Conclusions 81

CINQUIÈME PARTIE :
Discussion générale 83
Chapitre XVIII. — *Substances endogènes et mise à fleur* 83
1. Transmissibilité du stimulus floral 83
2. Bloquage de l'induction florale par l'état non vernalisé... 84
3. Rôle indirect de l'acide gibbérellique dans la mise à fleur.. 84
Chapitre XIX. — *Contribution à la physiologie de la montaison* .. 85
1. Variations des substances endogènes de croissance :
a) Variations de ces substances avec le phénomène de montaison. 86
b) Variations des substances de croissance avec les conditions climatiques. 88
2. Identité et propriétés des substances mises en évidence :
a) Les substances A, B, C, D et F. 89
b) Les substances E 89

Résumé 95

Références bibliographiques 97

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

« Les mécanismes physiologiques de la dominance apicale. »

Vu et approuvé :
Paris, le 26 mars 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

Nemours - Imp. André Lesot 15-6-62
Dépôt légal 505-2-62

EXPLICATION DE LA PLANCHE I

Greffage du chrysanthème « Honeysweet » (H) sur la variété « Shuokan » vernalisée (SV), en jours longs de 17 heures. Aspect des plantes 7 mois après le début de l'expérience.

A gauche : « Honeysweet » non greffé resté à l'état végétatif.

A droite : « Honeysweet » greffé (2 fois) sur « Shuokan » vernalisé : le porte-greffe a fleuri et a induit la floraison du greffon, bien qu'il ait été maintenu en photopériode défavorable.

ERRATUM

Planches I, II, III, V et VI, *au lieu de* HARADA phot., *lire* Photo Phytotron, Gif.

Planche IV, *au lieu de* HARADA phot., *lire* Photo LOD.

Explication de la planche III, 4e ligne, *ajouter* (HARADA et NITSCH, 1959 b).

Explication de la planche IV, dernière ligne, *ajouter* (HARADA, 1960).

Explication de la planche V, 7e ligne et dernière ligne, *ajouter* (HARADA et NITSCH, 1961).

Explication de la planche VI, 5e ligne et dernière ligne, *ajouter* (HARADA et NITSCH, 1961).

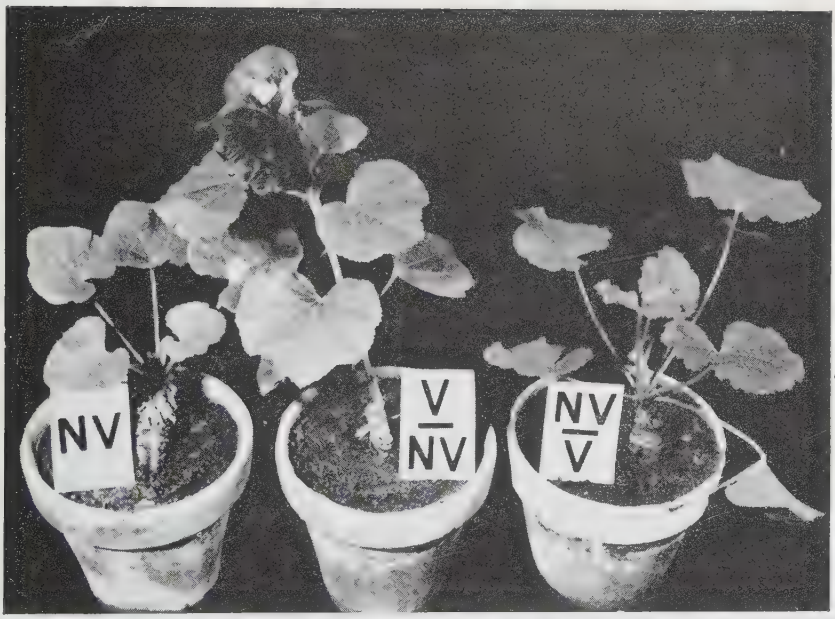
HARADA phot. GRIMARD sc.

Greffes de Chrysanthème

Planche II

Aspect de 3 roses trémières (var. Fordhook Giant Double Scarlet). 3 mois après le greffage.

NV : plante témoin, non vernalisée. $\frac{V}{NV}$: bourgeon vernalisé greffé sur racine non vernalisée. $\frac{NV}{V}$: bourgeon non vernalisé greffé sur racine vernalisée.



Harada phot. Grimard sc.

Roses-trémières greffées

Planche III

1. — Aspect de deux plantes de *Rudbeckia speciosa* deux mois après le début du traitement par la substance E en jours courts.

T — témoin resté en rosette ; E = plante traitée à la substance E (plante ayant fleuri la première de cette série).

2. – Aspect, 4 mois après le début du traitement, de 3 *Rudbeckia speciosa* élevés en jours courts de 10 heures.

T = témoin resté en rosette ; A = plante traitée avec l'éluat de la zone chromatographique correspondant à la substance E : extrait de plantes induites ; B — plante traitée avec l'éluat de la zone chromatographique correspondante à la substance E : extrait de plantes non induites.

1

2

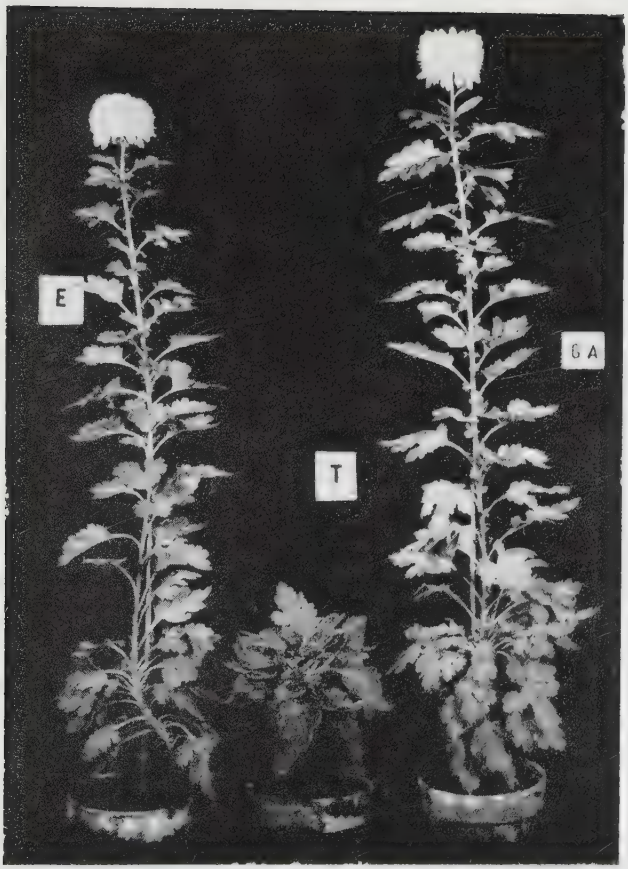
HARADA phot. GRIMARD sc

Rudbeckia speciosa

Planche V

Aspect de trois chrysanthèmes « Shuokan » non vernalisés, 22 semaines après le début des traitements. E : plante traitée à la substance E extraite d'apex de « Shuokan » vernalisé. GA : plante traitée à l'acide gibbérellique.

T : témoin non vernalisé (voir Tableau VIII).



Harada phot. Grimard sc.

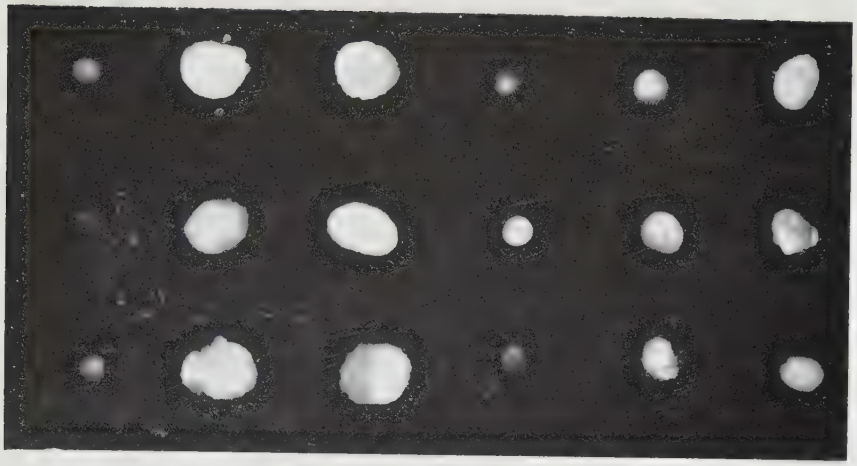
Chrysanthèmes « Shuokan »

Planche V

1. — Effet de l'acide 3-indolyl-acétique et de la substance E de rose-trémière sur la prolifération des cultures de parenchyme vasculaire de topinambour (clône P 17).

Aspect de morceaux de topinambour 5 semaines après l'ensemencement. A = série témoin ; B = AIA 0,1 mg/l. ; C = AIA 0,1 mg/l. + substance E 0,1 mg/l. ; D = Substance E 0,01 mg l. ; E = Substance E 0,1 mg l. ; F = Substance E 1 mg/l.

2. — Aspect de roses-trémières bisannuelles (var. Fordhook Giant Double Scarlet) non vernalisées, 5 mois après le début des traitements avec de l'acide gibbérellique (GA), avec de la lanoline hydratée (T) et avec de la substance E (E). Les plantes de gauche et de droite sont « montées », tandis que le témoin restait en rosette.



1

2

HARADA phot. GRIMARD sc

1. — Tissus de Topinambour
2. — Roses-trémières

Planche VI

1. — Induction de la floraison du *Rudbeckia speciosa* en journées courtes de 10 h par la substance E de rose-trémière (*à gauche*) et par l'acide gibbérellique (*à droite*).

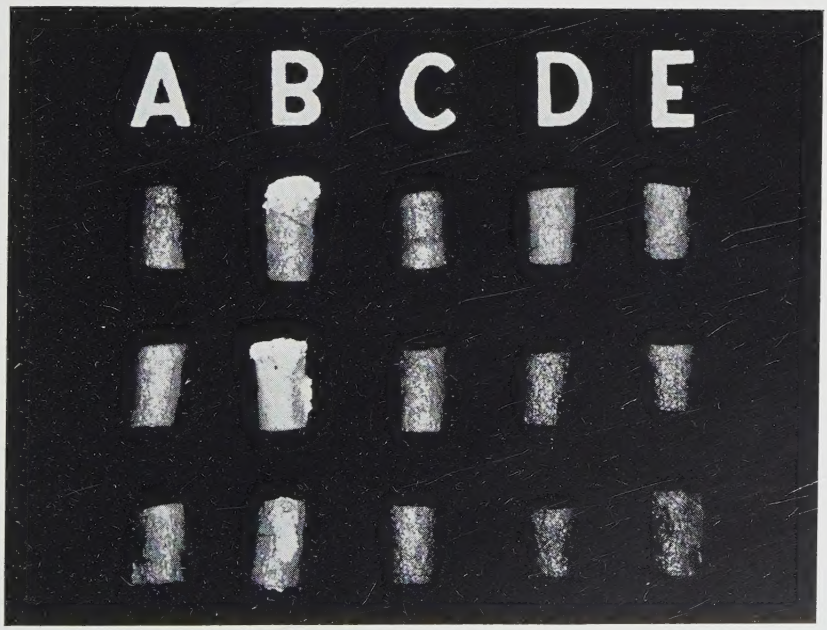
T = témoin traité à l'eau (*au milieu*).

2. — Effet de la kinétine et de la substance E de rose-trémière sur la prolifération de la moëlle de tabac (Wisconsin 38) cultivée *in vitro*.

Photo prise après 5 semaines de culture à 30°C et sous un éclairement de 18 heures de lumière artificielle par jour.

A = série témoin ; B = kinétine 0,1 mg/l. ; C = substance E 0,01 mg/l. ; D = substance E 0,1 mg/l. ; E = substance E 1 mg/l.

1



2

HARADA phot. GRIMARD sc.

1. — *Rudbeckia speciosa*
2. — Moelle de tabac.